

***Zelluläre Funktionen der Faktor VII aktivierenden Protease  
(FSAP) und die Rolle von  
extrazellulärer RNA als ein neuer Cofaktor der Enzymaktivierung.***

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie an der  
Justus-Liebig-Universität Giessen.

vorgelegt von Dipl.-Biol. Christian Kannemeier,  
geboren am 12. September 1971 in Hannover.

Giessen, im April 2003

## ***Inhaltsverzeichnis***

<i>Kapitel</i>	<i>Titel</i>	<i>Seite</i>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Hämostase-System des Menschen	1
1.1.1	Die primäre Hämostase	2
1.1.2	Die sekundäre Hämostase	3
1.1.3	Modulation der Hämostase	5
1.1.4	Fibrinolyse	6
1.1.5	Mutationen in Proteinen der Blutgerinnungskaskade	7
1.1.6	Zelluläre Hämostase	7
1.2	Serinproteasen und ihre Inhibitoren	9
1.3	Die Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP)	10
1.4	Aufgabenstellung	12
<b>2</b>	<b>Material &amp; Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Isolierung der FSAP als Proenzym	14
2.1.1	Charakterisierung der isolierten FSAP	14
2.1.2	FSAP-Präparationen	15
2.2	Untersuchung der FSAP-Stabilität	16
2.2.1	Gelelektrophorese	16
2.2.2	FSAP-Antigen-Test	17
2.2.3	FSAP-Aktivitäts-Test	18
2.2.4	Stabilität der FSAP in humanem Plasma	18
2.3	Die FSAP und Zellen	19
2.3.1	Zellkultur	19
2.3.2	Zellproliferation und die FSAP	20
2.3.3	Zellmigration und die FSAP	21
2.3.4	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) p42/p44- und Protein-Tyrosin-Phosphorylierung und die FSAP	21
2.3.5	PDGF-BB und die FSAP	21
2.3.6	Apoptose Test	22
2.4	FSAP-Aktivität auf unterschiedlichen Zelltypen	23
2.4.1	Identifizierung der Substanzklasse der FSAP-Cofaktor-Aktivität	24
2.4.2	Isolierung der FSAP-Cofaktor-Aktivität aus konditioniertem Medium	24
2.4.3	Isolierung von RNA und Ribosomen	24

<i>Kapitel</i>	<i>Titel</i>	<i>Seite</i>
2.4.4	Bindungsstudien zwischen der FSAP und RNA	25
2.5	Gerinnungstest	25
2.5.1	RNA und die FSAP in der Gerinnung	26
2.5.2	RNA in der Gerinnung	26
2.5.3	RNA und Prekallikrein	26
2.6	Materialien	28
2.6.1	Geräte	28
2.6.2	Kommerzielle Kits	28
2.6.3	Puffer	29
2.6.4	Antikörper	29
2.6.5	Materialien	30
3	<b>Ergebnisse</b>	33
3.1	Isolierung und Autoaktivierung der FSAP	33
3.1.1	Isolierung der FSAP aus Plasma	33
3.1.2	Charakterisierung der isolierten FSAP	36
3.1.3	Aktivierung und Autoaktivierung der FSAP	37
3.2	Identifikation von RNA als zellulärer Cofaktor für die Einketten-FSAP	39
3.3	Zelluläre Eigenschaften der FSAP	43
3.3.1	Die FSAP inhibiert die PDGF-BB-vermittelte Proliferation und Migration von humanen glatten Gefäßmuskelzellen (humane VSMC)	43
3.3.2	Die FSAP inhibiert das PDGF-BB-induzierte Signal in VSMC durch Inhibition der Bindung von PDGF-BB an die Zelloberfläche	47
3.4	Die FSAP und sein zellulärer Cofaktor RNA in der Gerinnung	50
3.4.1	Die Einketten-FSAP wird während der Koagulation nicht aktiviert	50
3.4.2	RNA beschleunigt die Koagulation von rekalkifiziertem Plasma	50
4	<b>Diskussion</b>	54
4.1	FSAP-Isolierung und Autoaktivierung	54
4.2	RNA unterstützt die FSAP-Autoaktivierung	57
4.3	Die FSAP inhibiert die PDGF-BB-vermittelte Proliferation von glatten Muskelzellen	59
4.4	RNA beschleunigt die Blutgerinnung	63
5	<b>Zusammenfassung</b>	68
	<b>Referenzen</b>	70
	<b>Danksagung</b>	80

## ***Abkürzungen***

ATF	Aminoterminales Fragment von uPA
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
EPCR	Endothelialer ProteinC-Rezeptor
FSAP	Faktor VII-aktivierende Protease
HMW-Kininogen	„high molecular weight kininogen“
LDL	„low density lipoprotein“
mAb	Monoklonaler Antikörper
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PDGF	„platelet derived growth factor“
scuPA	„single chain urokinase plasminogen activator“
scuPA-Gly158	Enzymatisch inaktive Mutante von scuPA
SDS-PAGE	„sodium dodecylsulfate“-Gelelektrophorese
TF	„tissue factor“
TFPI	„tissue factor pathway inhibitor“
tPA	„tissue type plasminogen activator“
uPA	„urokinase plasminogen activator“
VEGF	„vascular endothelial growth factor“

## 1. Einleitung

Alle zoologischen Organismen mit einer Größe über 1 mm haben, bis auf wenige Ausnahmen wie *Ctenophora* und *Cnidaria*, ein echtes zirkulierendes Kreislaufsystem entwickelt. Das Kreislaufsystem kann von einem einfachen, offenem Kreislauf bei den *Evertebrata*, dem Hämocoel, bishin zu dem hochkomplexen, geschlossenen, zentralen Kreislaufsystem der *Mammalia* reichen. Auch die in diesem Kreislaufsystem zirkulierende Flüssigkeit läßt unterschiedliche Ausprägungen zu, sie dient jedoch immer dem gleichen Zweck, dem Transport und der Verteilung von Nährstoffen, Blutgasen, Hormonen, Vitaminen und Metaboliten, sowie der Aufrechterhaltung des Blut- bzw. des Körperdrucks. Diese Aufgaben können bei Organismen, die kleiner als 1 mm sind durch Diffusion erreicht werden (SIEWING, 1980). Der Verlust oder der längere Stillstand der Zirkulation endet bei allen Tieren mit einem Kreislauf mit dem Tod. Zur Vermeidung eines solchen Verlustes hat sich bei allen Tieren ein Mechanismus entwickelt, der letztendlich zu einer Verfestigung der im Kreislauf zirkulierenden Flüssigkeit an der Verletzungsstelle führt und damit den Stillstand der „Blutung“ bewirkt. Dieser Stillstand der Blutung hat nicht nur den Vorteil, den weiteren Verlust von Körperflüssigkeit zu verhindern, sondern auch, eine Kontamination von außen durch Mikroorganismen oder Verunreinigungen, die zu einer Sepsis führen können, zu verringern (KOOLMAN et al., 1998). Ein größerer Verlust an Körperflüssigkeit wird z.B. bei *Limulus polyphemus* durch einen Aggregationsprozess erreicht, den amöboide, in der Hämolymphe zirkulierende Zellen auslösen. Diese bilden Pseudopodien aus und entwickeln dadurch ein Netz, das die Verwundungsstelle abdichtet. Wenn eine Kontamination mit Bakterien oder deren Lipopolysaccharide erfolgt, können bei *L. polyphemus* amöboiden Zellen eine Substanz, sezernieren, die diese Fremdorganismen in einem Koagulations-ähnlichen Prozeß in ein Netzwerk einschließen und durch Lyse abbauen (LOEB, 1909; LOEB, 1910; IWANAGA et al., 1998). Sogar bei einzelligen Organismen wird ein Verlust des Cytoplasmas bei kleineren Verletzungen durch einen Präzipitationsvorgang an der Zelloberfläche vermieden, an dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Sulfhydrylgruppen der Zellmembran beteiligt sind (BELAMARICH, 1976).

### 1.1 Das Hämostase-System des Menschen

Das System zur Vermeidung von Blutverlusten findet seine komplexeste Ausprägung im Koagulations- und Fibrinolysesystem des Menschen. Das humane Blut besteht zu ca. 55% aus flüssigen und gelösten Bestandteilen, dem Blutplasma und zu ca. 45% aus zellulären Bestandteilen. Die zellulären Bestandteile sind aufgedgliedert in Erythrozyten, Leukozyten und

Thrombozyten. Die Erythrozyten stehen zu den Leukozyten in einem Verhältnis von ca. 600:1. Die Leukozyten unterteilen sich in die neutrophilen (59%), eosinophilen (2,4%) und basophilen (0,6%) Granulozyten sowie die kleinen und großen Lymphozyten (31%) und die Monozyten (6,5%). Die Thrombozyten sind kernlose, zelluläre Fragmente, die durch den Zerfall von Megakaryozyten im Knochenmark entstehen und eine der zentralen Rollen in der Koagulation spielen. Sie kommen in einer Konzentration von ca.  $250 \times 10^6/\text{ml}$  in einem gesunden Organismus vor. Im flüssigen Bestandteil des Blutes sind unterschiedlichste Proteine und andere Stoffklassen gelöst, von denen ein großer Teil mitverantwortlich für die Hämostase ist (SIEWING, 1980; HILDEBRANDT, 1998; KOOLMAN et al., 1998). Folgende drei Hauptbestandteile lösen durch ihre Interaktion miteinander die Hämostase aus: Die flüssigen Bestandteile des Blutes, die zellulären Bestandteile des Blutes und die Gefäßwand. Man unterscheidet zwei Phasen der Hämostase, die primäre und die sekundäre Hämostase.

### **1.1.1 Die primäre Hämostase**

Die primäre Hämostase bezeichnet den nach einer Gefäßverletzung zuerst auftretenden Prozeß, der durch eine Adhäsion von Thrombozyten an den Ort der Verletzung charakterisiert ist. Durch eine Verletzung kommt der im subendothelialen Gewebe vermehrt exprimierte von-Willebrandt-Faktor mit Blut in Kontakt. Die im Blut zirkulierenden Thrombozyten adherieren über ihren von-Willebrandt-Faktor-Rezeptor an von-Willebrandt-Faktor und befinden sich auf diese Weise innerhalb der ersten Sekunden am Verletzungsort (CLEMETSON et al., 2001). Nach diesem initialem Kontakt von Thrombozyten mit der subendothelialen Matrix treten auch andere Matrixproteine wie Kollagen, Fibronectin und Laminin über ihre jeweiligen Rezeptoren auf den Thrombozyten miteinander in Wechselwirkung (SAVAGE et al., 1998; FITZGERALD, 2001). Durch die Thrombozyten-Adhäsion werden diese aktiviert und verändern sich in ihrer Form von einem diskoiden zu einem abgeflachten, oberflächenvergrößerten Phänotyp. Während der Aktivierung kommt es zur Sekretion der  $\alpha$ -Granula mitsamt Inhaltsstoffen aus den Plättchen. Bei diesen Inhaltsstoffen der  $\alpha$ -Granula handelt es sich unter anderem um Thromboxan und ADP. Sie führen zu einer Aktivierung weiterer Thrombozyten und heften sich an der Verletzungsstelle an. Thromboxan wirkt vasokonstriktorisch auf das umgebende Gewebe und trägt so mechanisch zu einer Verkleinerung der Verletzung bei. Da sich die Thrombozyten bei ihrer Aktivierung in ihrer Form verändern, bildet sich ein grobmaschiges Netz an der Verletzungsstelle, das sich immer enger zusammenzieht und dadurch die Wunde verschließt (GAWAZ, 1999; RUGGERI, 2002). Dieses Netz bildet unter anderem die Grundlage für die sekundäre Hämostase (die plasmatische

Gerinnung), die gleichzeitig mit der primären Hämostase (der zellulären Gerinnung) ausgelöst wird.

### **1.1.2 Die sekundäre Hämostase**

Ähnlich der primären Hämostase, ist die Präsentation von „tissue factor“ (TF), der vermehrt im subendotheliale Gewebe exprimiert wird, der Beginn der sekundären Hämostase. TF bindet FVIIa, der mit ca. 1-2 % in seiner aktiven Form im Blut vorhanden ist. Der initiale Komplex aus TF/FVIIa kann nun durch Spaltung sowohl inaktiven FVII als auch inaktiven FX in die aktive Form überführen. Daraus resultiert sowohl eine höhere Konzentration des initialen Komplexes an TF/FVIIa als auch ein Anstieg des aktiven FXa (MORRISEY, 2001). Dieser membrangebundene Komplex aus TF und FVIIa aktiviert nicht nur FX sondern auch FIX; Es kommt zu einem positiven Feedback-Loop. Die Aktivierung von FIX zu FIXa führt zur Bildung eines weiteren, membrangebundenen „intrinsic tenase“-Komplex aus FIXa und FVIII, der ebenfalls FX zu FXa aktivieren kann. Auf diese Weise entsteht eine größere Menge FXa. FXa kann nun mit einer sehr geringen Effizienz Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) spalten. Sobald geringe Mengen Thrombin entstanden sind, wird FVIII und FV durch Thrombin aktiviert. Durch die Aktivierung von FVIII zu FVIIIa kann nun FIXa den membrangebundenen „intrinsic tenase“-Komplex mit FVIIIa ausbilden. Desweiteren führt die Aktivierung von FV zur Entstehung eines membrangebundenen Komplex aus FVa, FXa und Prothrombin, dem Prothrombinase-Komplex, der seinerseits mit einer höheren Effizienz Prothrombin zu Thrombin umzuwandeln vermag als FXa alleine. Durch diese Verknüpfung unterschiedlicher, sich gegenseitig aktivierender Komplexe kommt es zu einer extremen Amplifizierung des ursprünglichen Signals und damit zu einem schnellen Stillstand der Blutung nach einer Verletzung (DAVIE et al., 1964; MACFARLANE, 1964; MANN et al., 1990; MANN, 1999).

Die sekundäre Hämostase kann auch über einen zweiten Weg, die „Kontaktphase“, ausgelöst werden. In der Kontaktphase wird FXII durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen über einen selbstaktivierenden Mechanismus in FXIIa überführt und kann dadurch inaktives Prekallikrein zu aktivem Kallikrein spalten. Kallikrein wiederum vermag in einem Komplex an Zelloberflächen mit Kininogen ebenfalls FXII zu FXIIa aktivieren (WIGGINS et al., 1979; SHORE et al., 1987; SCHOUSBOE, 1993). Dieser positive Feedback-Loop führt zu einer hohen Konzentration an FXIIa, der FXI zu FXIa spaltet. FXIa kann nun, gebunden an den Kontaktphasen-Komplex, FIX aktivieren und der oben beschriebene Mechanismus zur FX-Aktivierung über den „intrinsic tenase“-Komplex bestehend aus FVIIIa und FIXa tritt

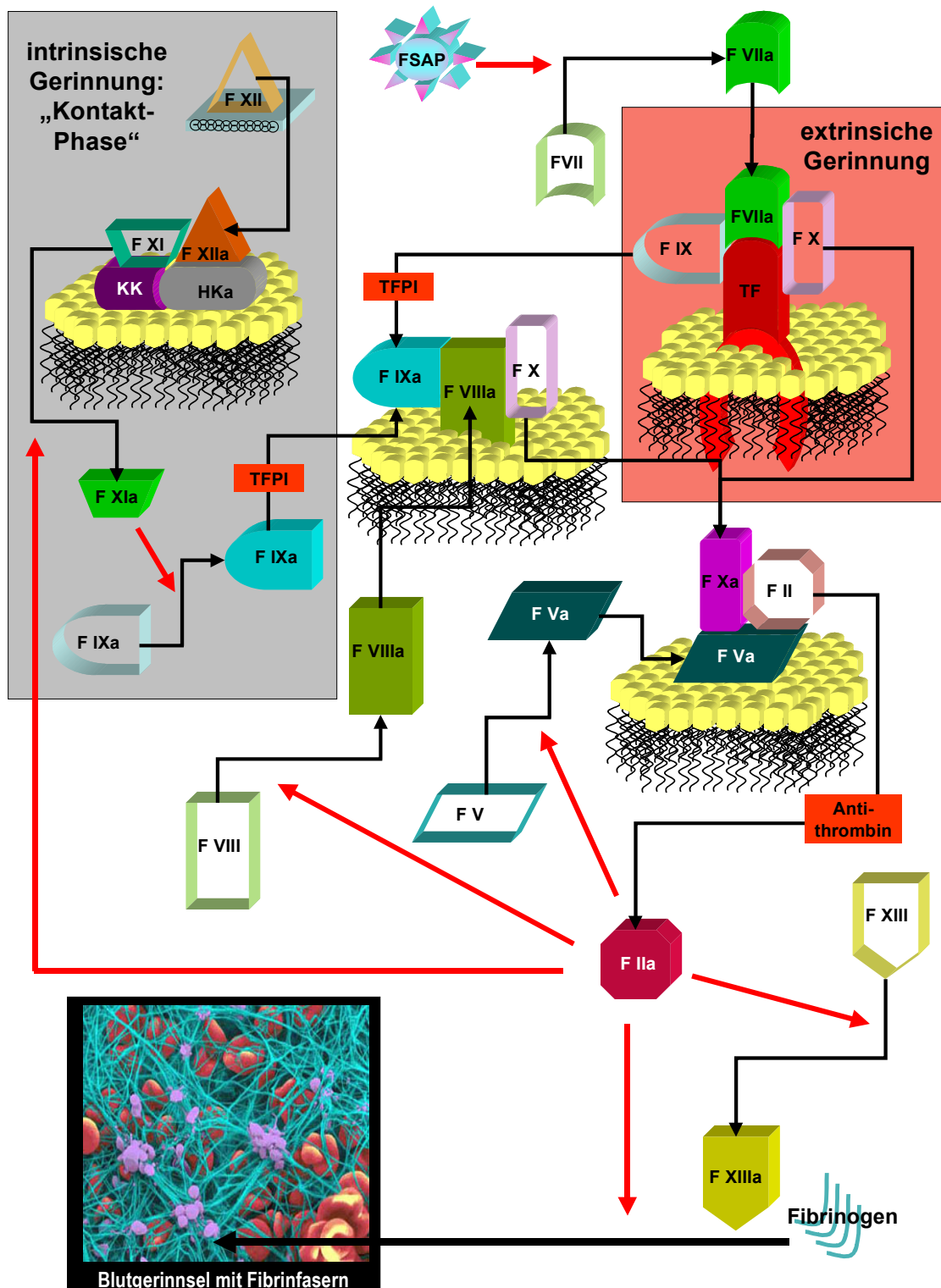


Abb. 1.1: **Schematischer Überblick über das Hämostase-System.** Inaktive Koagulationsfaktoren sind transparent, aktivierte Koagulationsfaktoren ausgefüllt dargestellt. Gerinnungsfaktoren können entweder direkt aktiviert werden (rote Pfeile) oder in einem Komplex aktiviert werden, wobei sie als inaktive Proenzyme an den Komplex gebunden und als aktive Enzyme aus dem Komplex entlassen werden (schwarze Pfeile). Inhibitoren der Gerinnung sind mit rotem Untergrund dargestellt. TFPI: TF pathway inhibitor. KK: Kallikrein. HKa: aktives HMW-Kininogen. Die Blutgerinnungsfaktoren sind als römische Ziffern angegeben. Die Oberflächen auf denen die Komplexbildung der Gerinnungsfaktoren stattfindet sind entweder als Phospholipide oder als geladene Oberflächen dargestellt. Im Blutgerinnsel mit Fibrinfaser sind Fibrinfasern türkis, Thrombozyten violett und Erythrozyten rot dargestellt. Nach COLMAN et al, 1994.



erneut in Kraft (THOMPSON et al., 1979; SILVERBERG et al., 1980; SCHMAIER et al., 1999). Nach der Bildung von Thrombin spaltet es Fibrinogen in Fibrin-Monomere, die wiederum durch die Transglutaminase FXIIIa, die ebenfalls durch Thrombin aktiviert wird, zu Fibrinpolymeren vernetzt werden (FENTON, 1986).

Die Mechanismen, die zu einer Komplexbildung der gerinnungsaktiven Faktoren auf der Zelloberfläche führen, sind  $\text{Ca}^{2+}$ - und VitaminK-abhängig. In den Faktoren II, VII, IX und X werden posttranslational 10-12 hintereinander angeordnete N-terminale Glutamat-Reste in einem VitaminK-abhängigen Enzymsystem carboxyliert, wodurch aus den Glutamat-Resten  $\gamma$ -Carboxy-Glutamat entsteht. Das  $\gamma$ -Carboxy-Glutamat hat eine wesentlich höhere Affinität zu  $\text{Ca}^{2+}$  als Glutamat alleine. Die chelatorischen Eigenschaften des  $\gamma$ -Carboxy-Glutamats führen dazu, dass sich die oben genannten Faktoren wesentlich besser an die Phospholipidmembran der Zellen über  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen anheften können, als Proteine, die diese Gla-Domäne, z.B. durch Mutation, nicht besitzen (STENFLO et al., 1974; ESMON et al., 1976; STRYER, 1994).

### **1.1.3 Modulation der Hämostase**

Durch die primäre und sekundäre Hämostase bilden sich auf diese Art und Weise zwei Netzwerke, die miteinander verflochten sind und die Stelle der Verletzung abdichten. Da sich viele der initialen Komplexe (TF/FVIIa/FXa, „intrinsic tenase“-Komplex und Prothrombinase-Komplex) nur an Phospholipiden der Zellmembran assoziieren können, ist die Präsenz von Zelloberflächen für die Gerinnung essentiell (MANN et al., 1990). Durch die Lokalisation der Komplexe auf der Zelloberfläche, bzw. auf den aktivierten Thrombozyten wird die Koagulation auf die Stelle begrenzt, an der die Verletzung stattgefunden hat.

Ein anderer Lokalisierungs-Mechanismus dieser Art wird durch die Expression von Thrombomodulin hervorgerufen. Thrombomodulin ist ein negativer Feedback-Regulator für Thrombin, der auf der Lumenseite des Endothels exprimiert wird, und der eine hohe, reversible Affinität zu Thrombin besitzt. Im verletzten Endothel ist die Expression von Thrombomodulin erniedrigt, so dass Thrombin seine prokoagulatorische Funktion am Verletzungsort ausüben kann. Auf unverletztem Endothel kann Thrombomodulin Thrombin binden und dadurch seine prokoagulatorische Aktivität inhibieren. Trotzdem behält Thrombin die enzymatische Aktivität ProteinC zu aktivieren. Das passiert vor allem, wenn ProteinC an seinen zellulären Rezeptor, den endothelialen ProteinC Rezeptor (EPCR), gebunden ist und die beiden Rezeptoren Thrombomodulin und EPCR in unmittelbarer Nähe zueinander exprimiert werden. Aktives ProteinC wird von seinem Rezeptor entlassen und kann dann mit

Protein S als Cofaktor sowohl FVa als auch FVIIIa degradieren, wodurch die katalysierende Wirkung dieser Faktoren ausfällt und die prokoagulatorische Aktivität des Plasmas verringert wird. Dieser selbstabschaltende Mechanismus ist unter anderem dafür verantwortlich, dass sich das Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Gerinnungs-Enzymen auf die inaktive Seite verlagert, und die Fibrinolyse des Gerinnsels stattfinden kann.

Antithrombin blockiert im Zusammenspiel mit Heparin freie Enzyme, da die in Komplexen gebundenen Enzyme nicht für den Antithrombin/Heparin-Komplex zugänglich sind. Dadurch bleiben die aktiven, membrangebundenen Enzyme im verletzten Gewebe unbeeinträchtigt. Dadurch trägt Antithrombin maßgeblich zur Lokalisation des Gerinnungsgeschehens auf der Zelloberfläche bei. TF pathway inhibitor inhibiert vor allem den Koagulations-Initiierungs-Komplex aus FVIIa/TF/FXa durch seine drei Kunitz-Typ-Inhibitor-Domänen. Dadurch schaltet TFPI im Zusammenspiel mit dem beschriebenen Protein C-Weg die Blutgerinnung ab (ABILDGAARD, 1969; MAST et al., 1996; ESMON, 2001).

Eine besondere Eigenschaft des Koagulationssystems ist seine explosionsartige Entstehung, die vor allem durch veränderte Substratspezifitäten der gebildeten Komplexe hervorgerufen wird. So kann FVIIa im Komplex mit TF mit einer bis zu  $6 \times 10^4$  verbesserten Kinetik FX zu FXa aktivieren. Ebenso kann die Aktivierung von FX durch den intrinsischen tenase-Komplex FVIII/FIX mit einer bis zu  $3 \times 10^5$  erhöhten Geschwindigkeit stattfinden als wenn FIXa alleine vorliegt. Desweiteren wird auch die Affinität von FXa zu Prothrombin um den Faktor  $10^5 - 10^6$  erhöht, wenn FXa in einem membrangebundenen Komplex mit FVa agiert. Diese „intrinsische Verstärkung“ verursacht eine extreme Amplifikation des ursprünglichen Signals, so dass *in vivo* nur wenige Minuten vergehen, bis es zu einem Stillstand der Blutung kommt (ROSING et al., 1980; MANN, 1999).

#### **1.1.4 Fibrinolyse**

Der Mechanismus, der die Auflösung des Blutgerinnsels beschreibt ist die Fibrinolyse. Die Fibrinolyse wird gleichzeitig mit der Aktivierung der Kontaktphase ausgelöst. Kallikrein kann, ebenso wie FXII, auch die Plasminogen-Aktivatoren Urokinase (uPA) und „tissue type plasminogen activator (tPA)“ aktivieren. Sowohl die Plasminogen-Aktivatoren als auch Plasminogen haben eine hohe Affinität zu Domänen in den Fibrinpolymeren, die in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander liegen. Wenn Enzym (tPA) und Substrat (Plasminogen) an das Fibrinnetz binden, wird Plasminogen zu Plasmin gespalten und kann dann wiederum sein Substrat, die Fibrinpolymere, zu Fibrinmonomeren abbauen. Dieser Mechanismus stellt die Bildung des aktiven Enzyms an dem Ort sicher, an dem es benötigt

wird (COLLEN, 1999). Ebenso wie die Hämostase ist auch die Fibrinolyse einem modulierenden Mechanismus unterworfen, der vor allem durch den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) hervorgerufen wird. Dessen Bedeutung wird vor allem an Patienten deutlich, die kein aktives PAI-1 besitzen und an exzessiven Blutungen leiden (VERHEIJEN et al., 1984; FAY et al., 1992).

### **1.1.5 Mutationen in Proteinen der Blutgerinnungskaskade**

Das komplexe Zusammenspiel von Koagulation und Fibrinolyse reagiert extrem anfällig auf veränderte Konzentration von aktiven und inaktiven Faktoren der Gerinnung bzw. der Fibrinolyse. So verursacht ein Mangel oder eine Mutation der Blutgerinnungsfaktoren schwerwiegende Fehlleistungen des Hämostase-System. Ein Mangel an FVIII (Hämophilie A) oder FIX (Hämophilie B) führt zu einer verlängerten Blutungszeit und damit zu einer starken Blutungsneigung *in vivo*, während ein Mangel der Faktoren V, VII und X *in vitro* die Blutungszeiten verändert. Schwerwiegenden Blutungskomplikationen wie bei Hämophilie A oder B sind hier aber nicht zu erwarten. Ein Mangel an ProteinC und ProteinS geht mit einer Thrombophilie einher, was zu erwarten ist, da ProteinC und ProteinS eine negativ modulierende Wirkung auf die Thrombinaktivität haben (HILDEBRANDT, 1998; OWEN, 2001).

Die Erwartung, dass einem Mangel an Faktoren der Kontaktphase eine Blutungsneigung resultiert, wird durch Studien widerlegt, in denen Patienten trotz eines Mangels an Faktoren der Kontaktphase eher zu thromboembolischen Komplikationen tendieren (GOODNOUGH et al., 1983; LEVI et al., 1992) oder keine Symptomatik außer einer verlängerten *in vitro* Gerinnungszeit zeigen (WUEPPER, 1973; ABILDGAARD et al., 1974). Aus diesem Grunde gibt es immer mehr Theorien, die das Kontaktphasen-System nicht prokoagulatorisch sondern in einem gegenregulatorischen Mechanismus zur eigentlichen Hämostase und daher profibrinolytisch darstellen (COLMAN et al., 1997; MAHDI et al., 2002). Anhand dieser Erkrankungen kann man klar erkennen, in welchem umfassendem Ausmaß dieses System von der richtigen Konzentration aktiver und inaktiver Faktoren abhängt und durch diese zu beeinflussen ist.

### **1.1.6 Zelluläre Hämostase**

Viele dieser hämostatischen Prozesse führen zu einer Zellaktivierung und/oder zu Zellveränderungen. So kann der Koagulations-Initiierungs-Komplex aus TF/FVIIa/FXa Zellen stimulieren und so die Immunabwehr fördern, indem FXa, noch bevor er Prothrombin spaltet, die Protease-aktivierbaren Rezeptoren I + II (PAR1+2) aktiviert (RIEWALD et al., 2001). Desweiteren hat Thrombin selbst eine mitogene Wirkung auf glatte Muskelzellen, ebenfalls über die Aktivierung von PARs, und trägt so zu einer Regenerierung des Gewebes bei

(MCNAMARA et al., 1993; PATTERSON et al., 2001). Auch uPA wirkt mitogen auf Zellen, möglicherweise unabhängig vom uPA-Rezeptor (KANSE et al., 1997; STEPANOVA et al., 1999). Desweiteren wurde eine membranständige Protease beschrieben, die essentiell für das Zellwachstum ist und FVII unabhängig vom TF aktivieren kann, Hespín (TORRES-ROSADO et al., 1993; KAZAMA et al., 1995). Thrombozyten enthalten in ihren  $\alpha$ -Granula neben anderen Substanzen auch Zytokine, die sich aktivierend auf vaskuläre Zellen auswirken, wie z.B. platelet derived growth factor (PDGF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) (GAWAZ, 1999). Diese Aktivierung der vaskulären Zellen führt zu Zellmigration und Proliferation, prokoagulatorischen Mechanismen, wie einer vermehrten Expression von TF auf der Zelloberfläche von Endothelzellen, zu einer Internalisierung von Thrombomodulin, sowie zur Expression von PAI-1 (STERN et al., 1988; PEARSON, 1994; SLUPSKY et al., 1998).

Die Aktivierung des Gerinnungs-Systems führt in der Atherosklerose zu einem akuten Gefäßverschluß. Atherosklerose wird verursacht durch eine Fetteinlagerung von „low density lipoprotein (LDL)“ in die subendotheliale Matrix, die Intima der Gefäßwand. Die Einwanderung des LDL erfolgt passiv durch Diffusion, wird aber erleichtert durch die Anwesenheit von Lipoprotein(a), das mit der Gefäßwand interagieren kann. In der Intima aggregiert LDL durch Oxidation, Lipolyse und Proteolyse wodurch eine Strukturveränderung des LDL verursacht wird. Das veränderte LDL kann Endothelzellen zur Sekretion von Adhäsionsmolekülen anregen. Es erfolgt eine aktive Einwanderung von Monozyten und anschließender Aufnahme der Fetteinlagerungen. Dadurch werden die Monozyten zu Schaumzellen. Die Schaumzellen wiederum sekretieren nun Chemokine, die weitere Monozyten anlocken aber auch glatte Muskelzellen zur Migration und Proliferation anregen. Die migrierenden und proliferierenden Muskelzellen sezernieren fibrotische Substanzen, wodurch sich die Intima verdickt. Anfänglich werden sich die Verdickung zur abluminalen Seite ausstülpfen, im weiteren Verlauf aber auch in das Lumen des Gefäßes eindringen, es kommt zur Bildung einer fibrotischen Kappe. Durch Apoptose der Schaumzellen wird nun im nekrotischen Kern der Atherosklerose der Lipidanteil der Zellen freigesetzt. Es kommt zum Aufplatzen des nekrotischen Kerns und dadurch zu einer Aktivierung der Blutgerinnungskaskade. Ein Verschluß des Gefäßes durch einen Thrombus ist die Folge mit der möglichen Konsequenz eines Schlaganfalles oder eines akuten Herzinfarktes (LUSIS, 2000).

Die Restenose bewirkt ähnliches. Bei einem chirurgischen Eingriff mit dem Ziel, ein schon verengtes Gefäß zu erweitern, wird durch die Implantation eines Stents ein mechanischer Reiz auf das Gefäß ausgelöst. Dieser Reiz reicht aus, um die Zellen des

vaskulären Gewebes zur Migration und Proliferation zu veranlassen und dadurch das Gefäß wieder zu verschließen (MCBRIDE et al., 1988).

## 1.2 *Serinproteasen und ihre Inhibitoren*

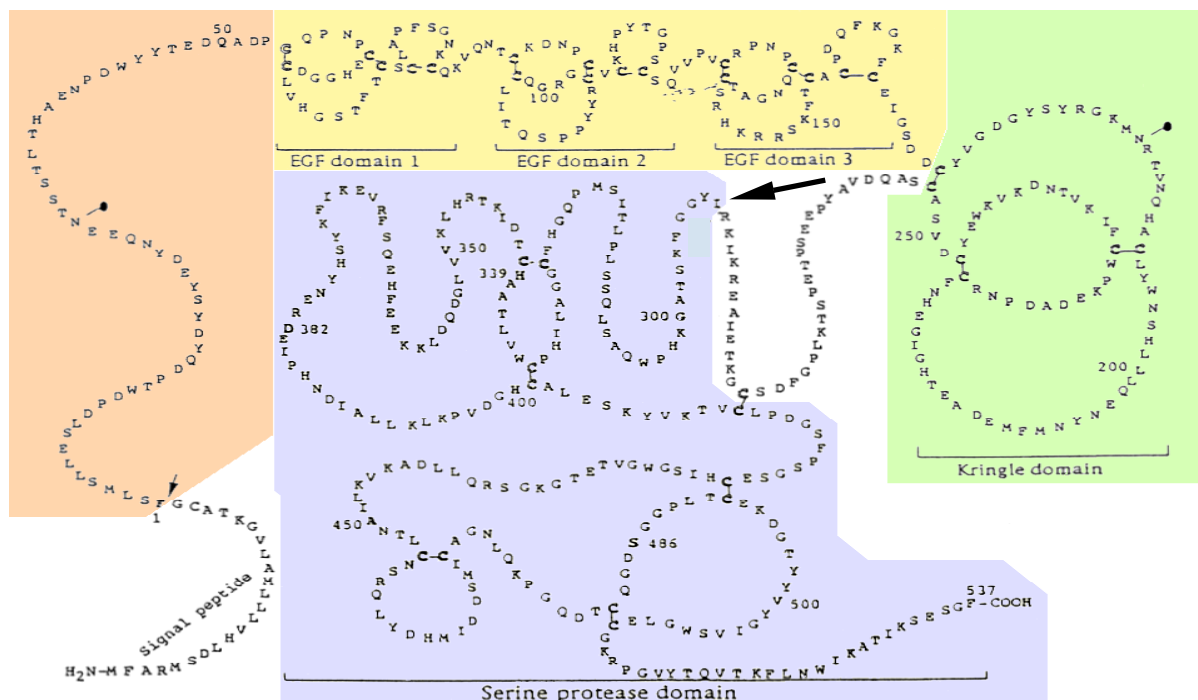
Die Elemente der Blutgerinnungskaskade sind in inaktive Cofaktoren, wie FV und FVIII, und in enzymatisch aktive Faktoren unterteilt. Alle enzymatisch aktiven Faktoren sind Serinproteasen. Eine Serinprotease zeichnet sich durch ihre katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren D-H-S (Asparagin, Histidin und Serin), aus. Damit diese katalytische Triade in die passende Konformation kommen kann, muß das Protein aktiviert werden, was oft durch eine Spaltung der Peptidkette durch ein anderes Enzym geschieht. Durch diese Spaltung ändert sich das Protein in seiner Konformation, und die drei Aminosäuren der katalytischen Triade, die normalerweise entfernt voneinander liegen, kommen in unmittelbare Nähe zueinander. Durch diese Nähe und die Anordnung der Aminosäuren wird das Wasserstoffatom der Alkoholgruppe im Serinmolekül auf das Histidin übertragen, so dass dessen Imidazolring positiv geladen ist. Diese positive Ladung im Histidin wird durch elektrostatische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Carboxylatgruppe im Aspartat stabilisiert. Durch das so entstandene reaktive Sauerstoffatom des Serinmoleküls kann der erste Schritt der hydrolytischen Spaltung des Substrats stattfinden. Die Säureamid-Bindung im Substratpeptid wird gespalten und es entsteht ein stabiler Acyl-Enzym-Komplex und ein freies Amin. Im zweiten Schritt der Hydrolyse, einer Deacylierung des Acylrestes im Enzym-Substrat-Komplex, entsteht eine freie Carboxylatgruppe im Substrat, das Substrat löst sich vom aktiven Zentrum und das Enzym kann mit einem neuen Substrat reagieren.

Während Enzyme mit einem breiten Wirkungsspektrum, wie z.B. das Verdauungsenzym Trypsin, keine regulatorische Untereinheit besitzen, wird bei den Blutgerinnungsenzymen die Spezifität für ein Substrat durch die regulatorische Untereinheit hervorgerufen (STRYER, 1994). Am Beispiel des Thrombin/Thrombomodulin-Komplexes wird die Bedeutung der regulatorischen Untereinheit deutlich. Thrombomodulin bindet Thrombin an der Anionen-Exosite I und verhindert dadurch die Bindung von Thrombin-Substraten wie FV, Fibrinogen oder FVIII an das aktive Zentrum ohne das aktive Zentrum an sich zu verändern. Thrombomodulin-gebundenes Thrombin kann jedoch ProteinC an seinem Rezeptor EPCR aktivieren, da ProteinC an Thrombomodulin und Thrombin bindet (FUENTES-PRIOR et al., 2000). Durch eine Veränderung der regulatorischen Untereinheit einer Serinprotease kann also deren Substratspezifität beeinflusst werden.

Wie weiter oben beschrieben kommt den Inhibitoren der Serinproteasen, den Serpinen, eine zentrale Bedeutung in der Modulation der Gerinnung zu. Grundsätzlich gibt es zwei unterschiedliche Arten von Serpinen, die sich in der Bindung an das aktive Zentrum unterscheiden. Serpine, die kovalent an das zentrale Serin der katalytischen Triade der Protease binden, inhibieren das Enzym irreversibel. In der Blutgerinnung und der Fibrinolyse kommt diese Form jedoch nicht vor. Von weitaus größerer Bedeutung sind hier die Inhibitoren, die eine nicht kovalente Bindung mit dem Serin am aktiven Zentrum ausbilden. Bei diesen Serpinen kann die Peptidbindung im Serpin von dem Enzym nicht gespalten werden, die Affinität des Serpin zum Enzym blockiert allerdings das aktive Zentrum und inhibiert dadurch die enzymatische Aktivität. Vertreter dieser Klasse der Inhibitoren sind TFPI, Antithrombin aber auch PAI-1 (ESMON, 2001; ILIES et al., 2002).

### 1.3 Die Faktor VII-aktivierende Protease (FSAP)

Die FSAP wurde 1996 als ein „plasma hyaluronan binding protein (PHBP)“ isoliert und beschrieben (CHOI-MIURA et al., 1996). Sowohl der Genlokus der FSAP beim Menschen auf dem Chromosom 10, als auch die cDNA der murinen FSAP sind bekannt (HASHIMOTO et al., 1997; SUMIYA et al., 1997). Die FSAP besteht aus einer für Koagulationsenzyme typischen Konformation, drei EGF-Domänen, einer Kringle-Domäne und der Serinproteasen-Domäne



**Abb. 1.2: Die Primärstruktur der FSAP mit sekundären Merkmalen.** FSAP besteht aus der leichten Kette mit der Serinprotease-Domäne (blau) und der schweren Kette, die die Kringle-Domäne (grün) und die drei EGF-Domänen (gelb) enthält. Das Signalpeptid besteht aus 23 Aminosäuren und wird beim Ausschleusen von FSAP aus der Zelle entfernt. Die Spaltstelle für die Aktivierung ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Nach CHOI-MIURA et al., 1996.

(Abb. 1.2). Die FSAP hat eine Homologie von 36 % zu dem „hepatocyte growth factor activator (HGFA)“ in Bezug auf die Aminosäureabfolge, allerdings eine 66 % ige Homologie in der Tertiärstruktur. Ähnliche Homologien bestehen zu anderen Mitgliedern der Serinprotease-Familie, FXII, tPA und uPA. Die Größe der FSAP liegt bei ca. 64 kDa ohne das Signalpeptid mit einer Länge von 23 Aminosäuren (CHOI-MIURA et al., 1996).

Die Arbeitsgruppe, die die FSAP ursprünglich isolierte, konnte dem Enzym keine biologische Aktivität zuordnen. Später wurde die FSAP auch über eine Heparin-Affinitätschromatographie aufgereinigt und ein zweites Synonym, die „plasma hyaluronan binding serine-protease (PHBSP)“ eingeführt (HUNFELD et al., 1999). Sie besitzt demnach Affinität zu Komponenten der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche, zu Hyaluronsäure und Glycosaminoglycanen. Mit den oben beschriebenen Methoden konnte die FSAP allerdings nur als aktives und teilweise fragmentiertes Enzym aus Plasma aufgereinigt werden. Die Stabilität der isolierten Protease *in vitro* ist sehr gering, im besonderen in der Gegenwart von Heparin und  $\text{Ca}^{2+}$ , so dass eine Eigenaktivierung postuliert wurde. Interessanterweise wirkte  $\text{Zn}^{2+}$ , ein anderes bivalentes Kation inhibierend auf die FSAP-Aktivität. Ebenso diskutierte man ein inaktives Zymogen im Plasma diskutiert, was aber bis jetzt nicht bewiesen ist (HUNFELD et al., 1999; ROMISCH et al., 1999; ROMISCH et al., 1999). Aus der isoliertem, fragmentierten FSAP konnten zwei Hauptfragmente durch N-terminale Analyse sequenziert werden, die sich später als die schwere Kette (45 kDa) und die leichte Kette (28 kDa) herausstellen sollten. Die leichte Kette enthält die komplette Serinproteasen-Domäne, während die schwere Kette die drei EGF-Domänen und die Kringle-Domäne enthält (ROMISCH et al., 1999). Durch Spaltung der FSAP-Peptidkette wird die inaktive FSAP (Einketten-FSAP) in die aktive FSAP überführt, die nur durch Disulfidbrücken zusammengehalten wird und deswegen unter reduzierenden Bedingungen in die leichte und die schwere Kette zerfällt (Zweiketten-FSAP).

RÖMISCH et al. publizierten 1999 zwei biologische Funktionen der FSAP. Erstens kann die FSAP FVII in der Abwesenheit von TF FVII aktivieren (ROMISCH et al., 1999) und zweitens ist die FSAP in der Lage, die Vorläufer der Plasminogen-Aktivatoren Urokinase (uPA) und tPA durch Spaltung in die aktive Form zu überführen (ROMISCH et al., 1999). Durch die FVII aktivierende Wirkung der FSAP entsteht eine „FVIII inhibitor bypassing activity (FEIBA)“. FEIBA drückt aus, dass durch die Zugabe von aktiver FSAP zu Plasma, in dem FVIII funktionell blockiert ist, die Gerinnungszeit dieses Plasmas *in vitro* von langen Gerinnungszeiten wieder auf die Normalwerte zurückgeht (ROMISCH et al., 1999). Aber auch eine mögliche Funktion der FSAP in der Fibrinolyse wurde diskutiert (ETSCHEID et al., 2000; CHOI-

MIURA et al., 2001; ROMISCH, 2002; RÖMISCH et al., 2002). Es handelt sich bei der FSAP also um ein Enzym mit einer dualen Rolle in Gerinnung und Fibrinolyse.

Die Bindung der FSAP an Komponenten der extrazellulären Matrix wurde mehrmals beobachtet. Eine Bindung der FSAP an die von Endothelzellen produzierte extrazelluläre Matrix wurde dargestellt (KREB et al., 2002), so wie die Interaktion mit Fibrinogen und Fibronectin (CHOI-MIURA et al., 2001). Ein potenter Inhibitor der FSAP ist C<sub>1</sub>-Inhibitor, der auch als Teil eines im Plasma zirkulierendem Komplex aus FSAP und C<sub>1</sub>-Inhibitor beschrieben wurde (ROMISCH et al., 1999; CHOI-MIURA et al., 2001; ETSCHIED et al., 2002). Serpine der Kunitz-Typ-Inhibitor Familie wie  $\alpha_2$ -Antiplasmin oder Aprotinin können die enzymatische Aktivität der FSAP ebenfalls reduzieren. Interessanterweise wurde die FSAP in einem anderen biologischen Zusammenhang kürzlich identifiziert. Ein intrazelluläres Substrat der FSAP ist CTCF, ein Transkriptionsfaktor, der für die Prozessierung des amyloid- $\beta$ -Proteins in Nervenzellen zuständig ist (VOSTROV et al., 2000).

## 1.4 Aufgabenstellung

Aufgrund der FVII-aktivierenden und der Plasminogen-Aktiviator-aktivierenden Wirkung der FSAP, wird eine duale Rolle der FSAP in Fibrinolyse und Hämostase postuliert. Da sich ein Großteil der Gerinnung und auch der Fibrinolyse in Komplexen auf der Zellmembran abspielt und eine Affinität der FSAP für Komponenten der extrazellulären Matrix und der Zelloberfläche beschrieben wurde, ist davon auszugehen, dass die FSAP mit Zellen interagiert. Die vorliegende Arbeit soll eine Interaktion der FSAP mit vaskulären Zellen und deren Folgen zeigen.

Alle Faktoren der Blutgerinnung zirkulieren im humanen Plasma in einer inaktiven Proform und es wird auch für die FSAP von einem Zymogen im Plasma ausgegangen. Um alle folgenden Untersuchungen durchführen zu können, ist es unabdingbar, das Proenzym der FSAP im Plasma darzustellen und in definierter, ausreichender Menge zu isolieren. Desweiteren konnte die FSAP in bisherigen Publikationen nur als fragmentiertes und aktives Enzym isoliert werden. Als Grund dafür nimmt man eine Eigenaktivierung der FSAP an. Auch für diese Annahme fehlen die Beweise und es ist eine der Aufgaben dieser Arbeit, eine Autoaktivierung der FSAP in der Anwesenheit unterschiedlicher Substanzen zu zeigen.

Weiterhin ist es notwendig die physiologische Rolle der FSAP näher zu untersuchen. Die Erkenntnis möglicher Umstände einer FSAP-Aktivierung, könnten neue Überlegungen über die physiologische Rolle der FSAP zulassen, so dass sich diese Arbeit die Beobachtung der FSAP-Aktivität im zellulären und plasmatischen Milieu zum Ziel setzt.



Ein aktivierender Einfluß der FSAP auf die Blutgerinnung wurde von RÖMISCH et al. beschrieben, ebenso wie eine Aktivierung der Fibrinolyse durch die FSAP. Wie bei anderen Gerinnungsfaktoren auch, ist eine duale Rolle der FSAP in Hämostase und Fibrinolyse durchaus denkbar, aber eine Kontrolle der jeweiligen Aktivität ist unablässig. Daher ist es wichtig, die Umstände für eine mögliche prokoagulatorische und profibrinolytische Aktivität der FSAP zu untersuchen. Aus dem vorgestellten Aufgaben ergibt sich der folgende Arbeitsplan:

1. Die Darstellung der FSAP als Proenzym im humanem Plasma und die Isolierung der FSAP als Proenzym aus humanem Plasma.
2. Auto-Aktivierungsstudien des Proenzym der FSAP in der An- und Abwesenheit verschiedener Zelltypen.
3. Proliferations- und Migrationsverhalten vaskulärer Zellen in der Anwesenheit der FSAP.
4. Beobachtungen zum Verhalten der FSAP während der plasmatischen Gerinnung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden einen Einblick geben, unter welchen Gegebenheiten die FSAP eine stabile Konformation als Proenzym besitzt, und unter welchen Umständen die FSAP aktiviert wird. Desweiteren werden sich mögliche zelluläre Funktionen der FSAP aufklären, so dass sich ein Gesamtbild der möglichen Funktionen der FSAP ergibt, die es erlauben, die Aktivität und physiologische Funktion der FSAP vorhersagen zu können. Durch eine Aufklärung der physiologischen Wirkung der FSAP könnte das Hämostase-System besser erklärt werden, oder auch zu einem besseren Verständnis pathologischer Mechanismen wie Atherosklerose und Restenose führen.

## **2. Material & Methoden**

### **2.1 Isolation der FSAP als Proenzym**

Um die FSAP als Proenzym aus humanem Plasma zu isolieren, wurden zuerst eine Antikörper-Affinitätschromatographie, gefolgt von einer Anionen-Austauschchromatographie durchgeführt. Abschließend wurde die isolierte Protease in einen Stabilitäts-Puffer dialysiert, sterilfiltriert und bis zum Gebrauch bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

1,2 l Standard-Humanplasma nach erfolgter Kryofällung wurde auf einen pH von 6,0 eingestellt und mit Aprotinin bis zu einer Endkonzentration von 40 units/ml versetzt. Parallel dazu wurde der mAb677 auf einer BrCN-Sepharose bei einer Antikörperkonzentration von 3 mg/ml nach den Angaben des Herstellers immobilisiert. Die Plasmalösung wurde auf die Antikörpersäule mit einer Flußgeschwindigkeit von 4 ml/min aufgetragen und mit 7 Säulenvolumen 1M NaCl, 0,02 M Na-Citrat, 40 units/ml Aprotinin, 0,1 M Arginin, pH 6,0 und mit 2 Säulenvolumen 0,05 M Imidazol, pH 6,0, 40 units/ml Aprotinin gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit 130 ml 0,1 M Glycin, 0,05% Tween 80 (vol/vol), 40 units/ml Aprotinin, pH 2,5 eluiert, auf  $4^{\circ}\text{C}$  gekühlt und mit 1 M Na-Citrat, pH 3,0 auf pH 4,5 eingestellt. NaCl wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,3 M zu dem Eluat dazugegeben und 65 ml Aliquots wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung in der Anionen-Austauschchromatographie gelagert.

Eine MonoQ-Säule wurde mit 0,02 M Na-Citrat, 0,3 M NaCl, pH 4,5 äquilibriert, das Eluat der Antikörper-Affinitätschromatographie bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und aufgetragen. Nachdem die Säule mit dem Equilibrierungspuffer gewaschen wurde, wurde gebundenes Protein mit 0,02 M Na-Citrat, 1 M NaCl, pH 4,5 eluiert. Das Eluat wurde direkt in einen Überdruck-Ankonzentrator mit einer Membran mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa gegeben und bis zu einer Proteinkonzentration von ca. 3 mg/ml ankonzentriert. Anschließend wurde das Konzentrat auf eine mit HE-Puffer äquilibrierten PD10-Säule aufgetragen, der Durchfluß verworfen und Protein mit HE-Puffer eluiert, das Eluat aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur endgültigen Analyse gelagert.

#### **2.1.1 Charakterisierung der isolierten FSAP**

Um den Gehalt des Proenzym der FSAP zu bestimmen, wurden die Intermediate der Aufreinigung durch eine reduzierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließendem Western Blotting charakterisiert und in einem später beschriebenen FSAP-Antigen- und Aktivitätstest quantifiziert.

Desweiteren wurde die aufgereinigte FSAP in ihrer Proteinkonzentration anhand der Absorption bei  $A_{280\text{nm}}$  (korrigiert für  $A_{320\text{nm}}$ ) und durch eine Bestimmung des N-Gehaltes der Lösung mittels der Kjeldahl-Analyse bestimmt. Der Extinktionskoeffizient der FSAP ( $\epsilon_{280\text{ nm}, 0,1\%}$ ) wurde nach der Methode von GILL & VON HIPPEL (GILL et al., 1989) auf 1,48 berechnet.

Für eine N-terminale Sequenzierung wurden entweder 10  $\mu\text{g}$  der aktiven oder des Proenzym der FSAP einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blotting unterzogen. Die zu der FSAP korrespondierenden Banden wurden aus der PVDF-Membran ausgeschnitten und die N-terminale Sequenz der Proteine nach EDMAN & BEGG (EDMANN et al., 1967) bestimmt.

Um die genaue Größe, mögliche Dimere sowie den Stoke's Radius der FSAP festzustellen, wurde eine Größenausschlußchromatographie mit Superose6-Material durchgeführt. Die Säule wurde mit 0,15 M NaCl, 0,02 M Na-Citrat, pH 4,5 und Proteinen mit bekannter Größe und bekanntem Stoke's Radius äquilibriert und 100  $\mu\text{g}$  der Einketten-FSAP wurden auf die Säule aufgetragen. Proteinpeaks wurden mit einem Photometer bei 280 nm detektiert und dem Molekulargewicht des Standards zugeordnet.

Um eine Glykosilierung der FSAP festzustellen, wurde die FSAP unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting unterzogen. Die Glykosilierung wurde durch Reduktion der Kohlenhydrate mit anschließender Biotinylierung der reduzierten Kohlenhydrate mit Hilfe eines Immuno-Blot kits für Glykosilierungen dargestellt.

Eine isoelektrische Fokussierung von FSAP wurde mit Hilfe von IEF-Gelen und anschließender Silberfärbung durchgeführt.

Durch eine Berechnung der Ausbeuten jedes einzelnen Schrittes durch den FSAP-Antigen-Test kann eine genaue Abschätzung der Konzentration von im Plasma zirkulierender FSAP gegeben werden.

### **2.1.2 FSAP-Präparationen**

Um aus der aufgereinigten Einketten-FSAP aktive Zweiketten-FSAP herzustellen, wurden jeweils 2 ml einer Einketten-FSAP-Präparation mit 200  $\mu\text{l}$  einer 1 M Na-Citrat, pH 6,0 Lösung für 30 min bei 22°C behandelt und anschließend mit Hilfe einer PD10-Säule nach den Angaben des Herstellers wieder in HE-Puffer gebracht, sterilfiltriert, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die FSAP wurde irreversibel inhibiert, indem bei der oben angegebenen Methode zur Herstellung der Zweiketten-FSAP vor dem Umsalzen mit der PD10-Säule in HE-Puffer

PPACK bis zu einer Endkonzentration von 50  $\mu$ M hinzugegeben wurde, für weitere 2 h bei 22°C inkubiert und die FSAP-Aktivität festgestellt wurde. Falls keine FSAP-Aktivität gemessen werden konnte, wurde die Lösung gegen HBS in einem Dialyse-Schlauch mit einer Porengröße von 10 kDa dialysiert. Nach dem Dialysieren gegen HBS wurde nochmals die FSAP-Aktivität festgestellt und im Falle keiner Aktivität die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C bis zur Benutzung gelagert. Als PPACK-Kontrolle wurde HSA in der gleichen Proteinkonzentration wie die FSAP der oben beschriebenen Methode unterzogen.

Von allen FSAP-Präparationen wurden Proben entnommen um den genauen FSAP-Gehalt und die FSAP-Aktivität mit den später beschriebenen Methoden zu bestimmen.

## *2.2 Untersuchung der FSAP-Stabilität*

### **2.2.1 Gelelektrophorese**

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit 8-16%igen Tris/Glycin und mit 4-12%igen NuPage Polyacrylamid-Gelen durchgeführt. Die Proben wurden 1:2 mit SDS-Tris/Glycin Probenpuffer oder 1:4 mit NuPage Probenpuffer verdünnt und entweder mit oder ohne 0,01 M Dithiothreitol für 5 min gekocht. Nach der Gelelektrophorese nach Angaben des Herstellers wurden die Gele entweder mit Coomassie-Blau gefärbt oder auf eine Nitrocellulose-Membran nach den Angaben des Herstellers geblottet. Die Nitrocellulose-Membran wurde mit 3 % BSA (wt/vol) in TBST blockiert und mit einer Mischung aus jeweils 1  $\mu$ g/ml mAb677 und mAb1189 für 1 h inkubiert. Nach dem Waschen in TBST wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Schaf-anti-Maus-Antikörper inkubiert und die Peroxidase-Aktivität mit ECL-Plus auf einem Röntgenfilm detektiert. Alternativ wurde die Membran direkt mit 1 ml VectorPlus inkubiert und so die Membran direkt mit einem POD-sensitiven Farbstoff angefärbt.

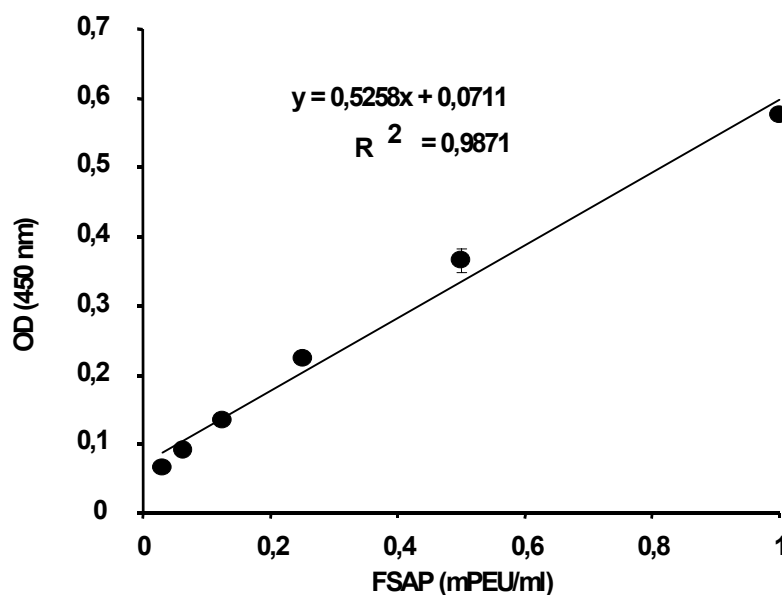
SDS-PAGE und Western Blotting wurde auch mit selbstgegossenen Gelen durchgeführt. Dazu wurde eine 10 %ige (vol/vol) Acrylamid-Lösung hergestellt und polymersiert. Die Proben wurden in 4fach konzentriertem SDS-Proben-Puffer aufgenommen und bei Bedarf mit 10 % (vol/vol)  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert und für 5 min gekocht. Die Elektrophorese wurde für 1,5 h bei 100 V in einem Tris-Glycin-Puffer durchgeführt. Nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran wurde die Membran dann mit 5 % (wt/vol) Magermilchpulver in TBST inkubiert. Die Detektion der FSAP erfolgte ansonsten wie oben beschrieben.

Für eine Elektrophorese von Nukleotiden wurde TAE-Puffer mit 1 % (wt/vol) Agarose versetzt und erhitzt. Im heißen, flüssigen Zustand wurde Ethidiumbromid 1:5000 in der

Agarose-Mischung verdünnt, das flüssige Gel in eine Elektrophorese-Kammer eingefüllt und durch Abkühlen bei 22°C erhärtet. Dann wurden die Proben auf eine Nukleotid-Konzentration von ca. 0,02 – 0,1 ng/µl verdünnt, 1:2 mit Proben-Puffer verdünnt und 10 µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese-Kammer wurde mit TAE-Puffer aufgefüllt und eine Spannung von 100 V für 45 min angelegt. Mit Ethidiumbromid gefärbte Nukleotide wurde durch Bestrahlung mit ultravioletterem Licht in einem GelDoc-System sichtbar gemacht.

### 2.2.2 FSAP Antigen-Test

Um die Menge der FSAP in den einzelnen Zwischenschritten der Aufreinigung und in anderen Proben feststellen zu können, wurde ein FSAP-Antigen Test auf ELISA-Basis etabliert. 96 well Mikrotiterplatten wurden mit 10 µg/ml pAb-K' in Coating-Puffer beschichtet. Die FSAP-haltigen Proben wurden in ELISA-Puffer verdünnt und in den wells für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligen waschen mit TBST wurde mit 1 µg/ml mAb677-POD für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurde die Peroxidase-Aktivität mit dem Substrat TMB nach den Angaben des Herstellers festgestellt. Standardhuman-Plasma wurde für die Standardkurve verwendet. Dazu wurde definiert, dass ein ml Plasma eine Plasma äquivalente Einheit (PEU) der FSAP enthält. Die Standardkurve umfaßte den Bereich von 0,03 – 2 mPEU/ml. Die FSAP-haltigen Proben wurden verdünnt, bis sie in den linearen Bereich der Standardkurve fielen. Eine typische Standardkurve ist in Abb. 2.1 dargestellt.



**Abb. 2.1: Standardkurve für den FSAP-Antigen-Test.** Ein polyklonaler anti-FSAP-Antikörper wurde auf einer Mikrotiterplatte beschichtet und mit Standard-Humanplasma in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:16.000 inkubiert. Anschließend wurde mit einem POD-markierten, monoklonalen anti-FSAP-Antikörper gebundene FSAP detektiert. Proben mit unbekannter Menge an FSAP wurden an dieser Standardkurve abgelesen. Die Kurvengleichung und das Bestimmtheitsmass sind angegeben.

### **2.2.3 FSAP Aktivitäts-Test**

Um zu demonstrieren, dass die FSAP während der Aufreinigung nicht ihre ursprüngliche Aktivität verloren hat mit seinen biologischen Substraten zu reagieren, wurde die Aktivität der FSAP gegen FVII, scuPA oder S-2288 wie vorher beschrieben detektiert (ROMISCH et al., 1999; ROMISCH et al., 1999).

Um eine Autoaktivierung der Einketten-FSAP festzustellen, wurde die Einketten-FSAP in 0,2 M NaCl, 0,02 M Na-Acetat, 0,05 % Tween 20 (vol/vol) auf eine Konzentrationen von 1,2 µg/ml verdünnt und mit zusätzlich entweder 3 mM Ca<sup>2+</sup>-Ionen oder 5 units/ml Heparin oder beiden Substanzen versehen. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 0 und 360 min bei 20°C wurden Proben entnommen und in den jeweiligen Puffer mit 0,3 mM S-2288 1:10 verdünnt. Die Absorption der Lösung bei 405 nm wurde jede Minute gemessen und die FSAP-Aktivität als mOD/min angegeben.

Zu jedem Zeitpunkt wurde ein Teil der Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt, gekocht um die FSAP zu inaktivieren und einer SDS-PAGE mit folgender Western-Blot-Analyse unterzogen, wie oben beschrieben. Um die Prourokinase-aktivierende Aktivität der FSAP zu messen, wurde die FSAP nicht in einen Puffer mit S-2288 verdünnt, sondern in den jeweiligen Puffer mit 0,3 mM S-2444 und 20 µg/ml scuPA 1:40 verdünnt und auch hier die Veränderung der Absorption der Lösungen bei 405 nm gemessen und die FSAP-Aktivität als mOD/min angegeben. Eine Kontrolle bei der nur scuPA mit S-2444 inkubiert wurde, schloß aus, dass scuPA sich selbst aktivierte, bzw. selbst eine Spaltung von S-2444 hervorrief.

Die oben beschriebene Methode zur Detektion der FSAP-Aktivität gegen S-2288 wurde auch als Standard-FSAP-Aktivitätstest verwendet. Zu diesem Zweck wurde die Einketten-FSAP auf eine Konzentration von 1,2 µg/ml in 0,2 M NaCl, 0,02 M Na-Acetat, 0,05 % Tween 20 und 0,3 mM S-2288 verdünnt und die zu testenden Substanzen hinzugegeben. Die Änderung der Absorption wurde für 60 min jede Minute bei 405 nm gemessen und die FSAP-Aktivität als mOD/min angegeben.

### **2.2.4 Stabilität der FSAP in humanem Plasma**

Durch Gerinnungsversuche mit anschließender Detektion des strukturellen Zustandes der FSAP wurde versucht die Frage zu beantworten, ob die FSAP während der Gerinnung oder der Fibrinolyse aktiviert wird. Dazu wurden Plättchen-reiches Plasma, dass durch Zentrifugation von antikoaguliertem Blut bei 100 g für 10 min hergestellt wurde, und Plättchen-armes Plasma, hergestellt durch Zentrifugation von antikoaguliertem Vollblut bei 1500 g für 10 min, für die folgenden Versuche verwendet. 150 µl Plättchen-armes und

Plättchen-reiches Plasma wurden entweder mit (a) 75 µl H<sub>2</sub>O, oder mit (b) 75 µl Clotting Reagenz, oder mit (c) 75 µl H<sub>2</sub>O und 20 µg/ml scuPA, oder mit (d) 75 µl Clotting Reagenz und 20 µg/ml scuPA für 45 min bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit geronnen beide Plasmen, die mit (b) und (d) inkubiert wurden, während die Plasmen, die mit (c) inkubierten auch einer vollständigen Lyse unterzogen wurden. Nach der Inkubation wurden die Plasmen für 5 min bei 2000 g zentrifugiert und 100 µl des Überstandes auf 1°C gekühlt und 2 ml eiskalte 5 mM Essigsäure hinzugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 10,000 g für 10 min bei 0°C wurde eine Probe des Überstandes mit SDS-Probenpuffer gemischt und für SDS-PAGE und Western Blotting vorbereitet. Das Pellet wurde mit 100 µl eiskaltem HE-Puffer aufgenommen, erwärmt und anschließend mit SDS-Probenpuffer gemischt und für SDS-PAGE und Western Blotting vorbereitet. Als Kontrolle wurde FSAP-Mangelplasma mit einer physiologischen Einheit der Zweiketten- oder Einketten-FSAP rekonstituiert und wie die oberen Proben behandelt.

## 2.3 Die FSAP und Zellen

Für alle Zellversuche wurde die FSAP über eine PD10 Säule nach den Angaben des Herstellers in 0,4 M NaCl, 4 mM HCl, 0,3 % (vol/vol) HSA überführt. Bei allen folgenden Zellversuchen wurden zur Kontrolle Proben, die nicht mit der FSAP inkubiert wurden mit der gleichen Menge 0,4 M NaCl, 4 mM HCl, 0,3 % (vol/vol) HSA inkubiert.

### 2.3.1 Zellkultur

Glatte, vaskuläre Muskelzellen der Maus (murine VSMC) und des Menschen (humane VSMC) wurden isoliert wie früher beschrieben (KANSE et al., 1997) und in DMEM (humane VSMC) oder in IMM (murine VSMC) mit 10 % (vol/vol) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 10 units/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat kultiviert. Humane Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) wurden aus Nabelschnüren isoliert wie früher beschrieben (KANSE et al., 1997), und in ECBM mit 5 % (vol/vol) FCS, 10 ng/ml hBFGF, 500 µg/ml Gentamycin, 500 ng/ml Amphotercin auf Gelatine beschichteten 10 cm Petrischalen kultiviert. Osteosarkomzellen (MG-63) wurden in dem gleichen Medium wie humane VSMC kultiviert. Sowohl Wildtyp chinesische Hamster-Ovarzellen (CHO), als auch Glycosaminoglycan-defiziente CHO-Zellen (CHO745) wurden in Ham-F12 mit 10 % (vol/vol) FCS, 10 units/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Na-Pyruvat kultiviert. Alle Zellen wurden in 10 cm Petrischalen bei 37°C in einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> gehalten.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen und anschließend solange mit 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, bis sie sich durch leichtes Klopfen von der Platte lösten. Die Zellen wurden dann in 9 ml DMEM aufgenommen, 3 min bei ca. 200 g zentrifugiert und in dem jeweiligen Kultivierungs-Medium aufgenommen und in neuen Schalen ausplattiert. HUVECs wurden nur bis zur fünften Passage für Experimente benutzt.

### **2.3.2 Zellproliferation und die FSAP**

Die Zellproliferation wurde sowohl durch Zellzählung als auch durch einen DNA-Synthese-Assay bestimmt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden in einer 24-well Platte  $1 \times 10^4$  humane VSMC/well ausgesät und für 2 Tage in DMEM kultiviert. Anschließend wurde das Medium gegen serumfreies ECBM mit 0.1 % (vol/vol) FCS ausgetauscht und die Zellen einen Tag kultiviert. Darauf wurden die Zellen mit PDGF-BB, mit und ohne die FSAP und mit und ohne Heparin wie in der Legende der Abbildung angegeben, stimuliert. Nach drei Tagen wurde das Medium gegen frisches Medium mit den gleichen Reagenzien ausgetauscht. Nach insgesamt 5 Tagen Stimulation wurden die Zellen mit HBS gewaschen, trypsinisiert und in einem Casy1-Counter gezählt.

Um die DNA-Synthese zu messen wurde ein Test verwendet, der auf dem Einbau von BrdU in die neuentstandene DNA und der Detektierung des BrdU mittels eines anti-BrdU-Antikörpers basiert.  $2 \times 10^3$  HUVEC,  $2 \times 10^3$  MG-63,  $3 \times 10^3$  murine VSMC oder  $1 \times 10^4$  humane VSMC wurden jeweils in einer 96-well Platte für 2 Tage in dem entsprechendem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für einen Tag in serumfreies DMEM überführt. Die Zellen wurden dann entweder in serumfreies DMEM mit 0,05 % (vol/vol) FCS (für MG-63), oder in serumfreies ECBM mit 0,05 % (vol/vol) FCS (für HUVEC), oder in serumfreies ECBM mit 0.1 % (vol/vol) FCS (für humane und murine VSMC) überführt. Die Testsubstanzen wurden wie in den Legenden angezeigt hinzugefügt und die Inkorporation von BrdU wurde nach den Angaben des Herstellers gemessen.

### **2.3.3 Zellmigration und die FSAP**

Die Migration von VSMC wurde mit einer Boyden-Kammer auf einer Kollagen Typ I-beschichteten Membran mit 8  $\mu$ m Poren getestet. Murine und humane VSMC ( $2,5 \times 10^4$ ) wurden in serumfreien ECBM mit 0.1 % (vol/vol) FCS in der oberen Kammer inkubiert. Zu der unteren Kammer wurden der jeweilige Puffer und die in der Legende angezeigten



Substanzen hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 37°C wurde die obere Seite der Membran von allen Zellen durch Kratzen befreit. Anschließend wurde die Membran in einer 1:1 Lösung von Aceton/Methanol für 30 min bei 22°C fixiert und in 5 % (wt/vol) Crystal Violet gefärbt. Nach intensivem Waschen wurden die Membranen auf einen Objektträger zum Trocknen ausgelegt und anschließend die Anzahl der an die Membran gebundenen Zellen durch Auswertung der optischen Dichte quantifiziert.

#### ***2.3.4 Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK) p42/p44- und Protein-Tyrosin-Phosphorylierung und die FSAP***

Humane VSMC ( $5 \times 10^4$ /well) wurden für 2 Tage in einer 24-well-Platte kultiviert und, nach dem Wechsel des Mediums in ECBM mit 0.1 % (vol/vol) FCS, für 15 min mit den Agonisten stimuliert, die in der Legende angegeben sind. Das Experiment wurde durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer mit 1 mM Orthovanadat gestoppt und die Proben wurden einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting unterzogen. Alternativ wurden Proben mit und ohne die FSAP, PDGF-BB und Heparin für 1 h bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit humanen VSMC inkubiert. Die phosphorylierte Form der MAPK p42/p44 wurde mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Aus derselben Probe wurde auch der Gesamtanteil an phosphorylierten Tyrosin-Resten und der Anteil an Gesamt-MAPK mittels spezifischer Antikörper gemessen.

#### ***2.3.5 PDGF-BB und die FSAP***

Die Wechselwirkung der FSAP mit PDGF-BB wurde sowohl durch den Einfluß der FSAP auf die Bindung von PDGF-BB an humane VSMC als auch durch die Bindung der FSAP selber an PDGF-BB untersucht.

Humane VSMC wurden bis zur Konfluenz in einer 24-well-Platte kultiviert und anschließend für 24 h in serumfreien DMEM gehalten. Nach intensivem Waschen wurde  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB in unterschiedlichen Konzentrationen mit und ohne die FSAP und Heparin auf den Zellen für 1 h bei 4°C inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde durch die Zugabe von 100 ng/ml nativem PDGF-BB bestimmt und später von der Gesamtbindung abgezogen. In einigen Experimenten wurde die FSAP, Heparin und  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB vor der Zugabe zu den Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die Zellen in SDS-Probenpuffer lysiert und die Radioaktivität der Proben in einem  $\gamma$ -Counter festgestellt. Anschließend wurden die Proben einer SDS-PAGE mit folgender Autoradiographie unterzogen.

Unterschiedliche FSAP-Präparationen (150 ng) wurden auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Nach dem Blockieren in 3 % BSA wurden 200 ng/ml PDGF-BB in 1 % (wt/vol) BSA in TBST mit unterschiedlichen Substanzen, wie in der Legende der Abbildungen angegeben, für 4 h bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen mit TBST wurde gebundenes PDGF-BB mit einem Antikörper nachgewiesen. Die Peroxidase Aktivität der Proben wurde mittels ECL, wie früher beschrieben, detektiert.

Desweiteren wurden auch 96-well-Platten mit 10 µg/ml der Einketten-FSAP beschichtet und anschließend für 1 h bei 37°C mit 3 % (wt/vol) BSA in TBS blockiert. Anschließend wurde PDGF-BB in ELISA-Puffer in unterschiedlichen Konzentrationen zu den wells gegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Nach intensivem Waschen mit TBST wurde gebundenes PDGF-BB wie oben beschrieben immunologisch detektiert. Die Peroxidase-Aktivität in jedem well wurde mit TMB nach den Angaben des Herstellers festgestellt.

Der strukturelle Zustand des PDGF-BB-Rezeptors wurde durch SDS-PAGE und Western Blotting beobachtet. Dazu wurden humane VSMC in einer 6-well-Platte bis zur Konfluenz kultiviert und für 1 h in serumfreien DMEM gehalten. Anschließend wurden die Zellen für 1 oder 24 h mit 12 µg/ml der Zweiketten-FSAP in serumfreien ECBM mit 0.1 % (vol/vol) FCS und 10 µg/ml Heparin mit und ohne PDGF-BB behandelt. Anschließend wurden die Zellen in SDS-Proben-Puffer lysiert und einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting unterzogen. PDGF-BB-Rezeptor wurde immunologisch nachgewiesen. Parallel dazu wurde die Gesamtmenge eines anderen Zelloberflächenproteins, des „low density lipoprotein related receptor (LRP)“, mit einem Antikörper festgestellt, um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen slots der SDS-PAGE zu beweisen.

### **2.3.6 Apoptose-Test**

Humane VSMC wurden auf einem 8-well-Objekträger ausgesät und wie für einen DNA-Synthese-assay behandelt. Nach erfolgter Stimulation mit den jeweiligen Substanzen wurden die wells mit einem Apoptose-kit behandelt, der darauf basiert, dass die einzelsträngigen Enden von DNA-Doppelstrang-Brüchen durch das TUNEL-Enzym mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops. Neben der internen Färbungskontrolle erfolgte eine weitere Positivkontrolle, in der Apoptose durch die Zugabe von 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert wurde.

## 2.4 FSAP-Aktivität auf unterschiedlichen Zelltypen

Die in der Legende angezeigten Zelltypen wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend für 1 h bei 37°C mit 3 % (wt/vol) BSA in HBS blockiert. Anschließend wurden 90 µl HBS, pH 9,0 mit 1 % (wt/vol) BSA und 0,3 mM des chromogenen Substrates S-2288 auf die Zellen gegeben. Einketten-FSAP wurde in 0,4 M NaCl, 4 mM HCl, 0,3 % (vol/vol) HSA auf 12 µg/ml verdünnt und 10 µl dieser Lösung wurden auf die Mikrotiterplatte gegen und die Änderung der Absorption jedes wells bei 405 nm gemessen.

Es wurde auch konditioniertes Medium der unterschiedlichen Zelltypen hergestellt. Dazu wurden konfluente 10-cm Petrischalen unterschiedlicher Zelltypen mit serumfreien DMEM für 1 h bei 37°C gehalten und anschließend mit HBS gewaschen. Dann wurden die Zellen für 10 min mit HBS, pH 9,0 inkubiert, der Überstand entnommen, sterilfiltriert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Überstand wurde dem oben beschriebenen Standard-FSAP-Aktivitätstest unterzogen.

### 2.4.1 Identifizierung der Substanzklasse der FSAP-Cofaktor-Aktivität

Das konditionierte Medium wurde einem tryptischen Verdau unterzogen, indem der Überstand für 1 h bei 37°C mit 10 units/ml Trypsin inkubiert wurde und anschließend mit 50 µg/ml SBTI für eine weitere Stunde bei 37°C behandelt wurde. Dann wurde die Lösung für 10 min gekocht, abgekühlt, zentrifugiert und 50 µl des Überstandes dieser Lösung dem Standard-FSAP-Aktivitätstest unterzogen.

Desweiteren wurden durch eine Butanol-Extraktion alle Lipide aus dem konditioniertem Medium entfernt indem 1 ml des Überstandes mit 1 ml gesättigtem Butanol ausgeschüttelt wurde. Nach dem Trennen der organischen und anorganischen Phase wurde die organische Phase im Rotationsverdampfer verdampft und das Pellet in HBS, pH 9,0 aufgenommen und 50 µl dieser Mischung dem Standard-FSAP-Aktivitäts-Test unterzogen, während die anorganische Phase direkt in den Standard-FSAP-Aktivitätstest eingesetzt wurde.

Zusätzlich wurde die Proteine des konditionierten Mediums durch eine Inkubation mit N-Glycosidase F von N-gebundenen Zuckerresten befreit und auch mögliche DNA- und RNA-Verunreinigungen des konditionierten Mediums wurden durch einstündige Inkubation bei 37°C mit 10 µg/ml DNase mit 2 mM Mg<sup>2+</sup>-Ionen oder mit 10 µg/ml RNaseA verdaut. Nach dem Verdau der DNA mit DNase wurden verbliebene Nukleotide durch Präzipitation in absolutem Alkohol aufgereinigt und in HBS, pH 9,0 aufgenommen. Das diente der Entfernung aller Mg<sup>2+</sup>-Ionen, die einen aktivierenden oder inhibierenden Einfluß auf die

FSAP haben könnten. Ein Aliquot von 50 µl wurde jeweils nach dem Verdau dem Standard-FSAP-Aktivitätstest unterzogen. HBS, pH 9,0, wurde in allen Tests als Kontrolle gleichbehandelt und später in den Aktivitäts-Test eingesetzt. Die relative Abweichung zu diesem Wert wird in dem Aktivitätstest angegeben.

#### **2.4.2 Isolierung der FSAP-Cofaktor-Aktivität aus konditioniertem Medium**

25 konfluente 10-cm Petrischalen mit CHO745-Zellen wurden der oben erwähnten Prozedur zur Gewinnung eines konditioniertem Mediums unterzogen. Das konditionierte Medium wurde dann auf eine mit 10 Säulenvolumen HBS, pH 9,0 äquilibrierten MonoQ-Säule mit einer Geschwindigkeit von 0,5 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 5 Säulenvolumen HBS, pH 9,0 wurde über ein Volumen von 50 ml die Salzkonzentration kontinuierlich in einem Gradienten von 0.15 M NaCl bis hin zu 1 M NaCl gesteigert und in 2,5 ml-Fractionen fraktioniert. Die Fraktionen wurden in Zentrifugationskonzentratoren mit einer Ausschlußgröße von 10 kDa ankonzentriert und in HBS, pH 9,0 aufgenommen und noch einmal um den Faktor 10 ankonzentriert. Anschließend wurden alle Fraktionen in einem Standard-FSAP-Aktivitätstest getestet und sowohl einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung als auch einer 1 %igen (wt/vol) Agarose-Gel-Elektrophorese unterzogen.

#### **2.4.3 Isolierung von RNA und Ribosomen**

RNA wurde von konfluenten Schalen unterschiedlicher Zelltypen mit Hilfe des RNeasy kits oder der Reagenz Trizol nach den Angaben des Herstellers isoliert. Um die Präsenz von Nukleotiden darstellen zu können, wurde die isolierte RNA auf ein 1 %iges (wt/vol) Agarose-Gel aufgetragen und mit Ethidiumbromid gefärbte Nukleotide durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

Ribosomen wurden aus konfluenten 10 cm-Petrischalen von CHO745-Zellen gewonnen wie früher beschrieben wurde (EIL et al., 1974). Parallel zueinander wurden zwei Präparationen durchgeführt, eine in der Anwesenheit von RNaseA, die andere in der Abwesenheit von RNaseA. Die Ribosomen-haltige Fraktion beider Präparationen wurde sowohl dem Standard-FSAP-Aktivitätstest unterzogen als auch der oben beschriebenen RNA-Isolierung.

#### **2.4.4 Bindungsstudien zwischen der FSAP und RNA**

BrCN-Sepharose (0,25 g) wurde nach den Angaben des Herstellers jeweils mit 1 mg PPACK-inaktiviertem FSAP, HSA oder Urokinase gekoppelt und anschließend mit HBS, pH 9,0 äquilibriert. Dann wurde entweder konditioniertes Medium oder gereinigte RNA auf die Säulen gegeben und die Säulen daraufhin gewaschen. Eluiert wurde die Säule mit HBS, 2 M NaCl, pH 9,0 in zwei Schritten. Das Eluat und alle anderen Intermediate wurden wie im vorherigen Abschnitt umgesalzen, ankonzentriert und dem Standard-FSAP-Aktivitätstest zugeführt, sowie auf einer Nukleotid-Elektrophorese aufgetrennt und alle Nukleotide mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

#### **2.5 Gerinnungstests**

RNA aus unterschiedlichen Quellen wurde in Plasma gegeben und die Gerinnungszeit des Standard-Humanplasmas mit Hilfe zweier unterschiedlicher Koagulations-Zeitnehmer (KC4 und Schnitger & Gross) oder eines turbidometrischen Tests bestimmt.

Im KC4 wird die Gerinnungszeit dadurch bestimmt, dass das Reaktionsgefäß rotiert und eine Stahlkugel in der Lösung durch ein Magnetfeld in der untersten Position gehalten wird. Erst bei Auftreten ausreichender Fibrininformation in der Lösung wird die Stahlkugel aus ihrer Position in dem Magnetfeld entfernt, wodurch die mitgelaufene Stoppuhr stehenbleibt. Im Schnitger & Gross ist das Reaktionsgefäß fixiert und die Gerinnung wird durch zwei Elektroden gemessen, die sich in der Lösung auf und ab bewegen. Sobald zwischen den beiden Elektroden ein Kontakt durch einen Fibrinfaden hergestellt wird, bleibt die mitgelaufene Stoppuhr stehen.

Im turbidometrischen Test wurde eine 96-well Mikrotiterplatte mit 3 % (wt/vol) BSA über Nacht blockiert und anschließend mit einer Mischung aus 30 µl Imi-Puffer mit 1 % (vol/vol) HSA mit der jeweiligen Testsubstanz beschickt. Anschließend wurde in alle wells 30 µl des Standard-Humanplasma gegeben und die Mischung für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Gerinnung wurde ausgelöst durch die Zugabe von 30 µl einer Mischung aus Imi-Puffer und 20 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , und die Absorption bei 405 nm gemessen. Durch die Änderung der optischen Dichte des Plasmas während des Gerinnungsvorgangs entsteht eine sigmoidale Kurve, an deren Deflektionspunkt die Gerinnungszeit abgelesen wurde. Um RNA mit anderen, typischen Gerinnungssubstanzen vergleichen zu können, wurde eine Standardkurve aus Kaolin in dem Konzentrationsbereich von 3 – 10.000 ng/ml erstellt und die Gerinnungszeit als Kaolin äquivalente Einheit (KEU/ml) angegeben. Da mit fallender Konzentration Kaolin auch eine höhere Standardabweichung des turbidometrischen Tests einsetzt, wurde ein

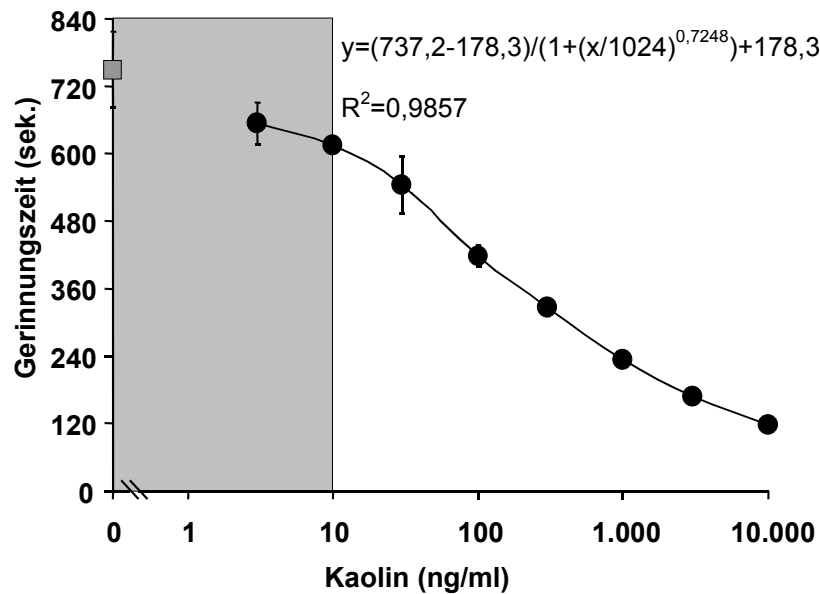


Abb. 2.2: Typische Standardkurve für einen turbidometrischen Gerinnungstest. Unterschiedliche Konzentrationen Kaolin sind als Kreise dargestellt, die Gerinnungszeit ohne Zusätze ist auf der y-Achse als graues Quadrat dargestellt. Das Signifikanzlimit von 10 KEU/ml ist grau unterlegt

Signifikanzlimit von 10 KEU/ml eingesetzt. Alle Werte über 10 KEU/ml (equivalent zu 10 ng/ml Kaolin) wurden als signifikanter Einfluß auf die Gerinnung gedeutet. Eine typische Standardkurve ist in Abb. 2.2 dargestellt.

Bei allen drei Gerinnungstest blieb das Verhältnis von Imi-Puffer mit unterschiedlichen Substanzen, Plasma und

Imi-Puffer mit  $\text{Ca}^{2+}$  gleich. So wurden bei Schnitger & Gross und KC4 von jeder dieser Substanzen 100 µl eingesetzt, während im turbidometrischen Test von jeder Substanz 30 µl eingesetzt wurden.

Ebenso wurde FSAP-Mangelplasma mit und ohne RNA auf seine Gerinnungsaktivität hin getestet und die mAb 677 und mAb570 in einer Konzentration von 50 µg/ml in den Gerinnungstest eingesetzt. Um weiterhin die Funktion von RNA in der Gerinnung zu charakterisieren, wurden unterschiedliche Mangelplasmen auf ihre RNA-Aktivierungsfähigkeit getestet.

Desweiteren wurde auch die Plättchen-aktivierende Wirkung von RNA und der FSAP getestet. Plättchen-reiches Plasma von unterschiedlichen, gesunden Individualspendern wurde entweder mit 20 µg/ml der Zweiketten-FSAP oder mit 100 µg/ml Hefe-RNA inkubiert und mit 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  rekalkifiziert. Durch die Messung der Abnahme der optischen Dichte des Plättchen-reichen Plasmas gegenüber eines Plättchen-reichen Plasma ohne Zugabe von Substanzen in einen Plättchen-Aggregometer kann auf die Fähigkeit der Plättchen untereinander zu aggregieren geschlossen werden. Als Positivkontrolle wurden die Plättchenaggregation durch 10 mM ADP induziert.

### **2.5.1 RNA und die FSAP in der Gerinnung**

Standard-Humanplasma wurde in einem Wasserbad bei 37°C bis zur Auflösung der gefrorenen Phase aufgetaut und dann bis zur Verwendung auf Eis gelagert, mit einer maximalen Standzeit auf Eis von 3 h. Plasma (100 µl) wurde vor dem Test bei 37°C für 15 min erwärmt und mit einer Mischung aus 100 µl Imi-Puffer mit 1 % (vol/vol) HSA und 300 µg/ml RNA aus *Torula*-Hefe versetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Gerinnung wurde ausgelöst durch die Zugabe von 100 µl 20 mM Ca<sup>2+</sup> in Imi-Puffer.

Um einen Einfluß der FSAP auf dieses System zu beobachten, wurde der oben beschriebene Test für den KC4 auch mit FSAP-Mangelplasma und in der Anwesenheit von jeweils 50 µg/ml mAb570 und mAb677 durchgeführt.

Als Kontrolle diente bei allen Tests, in denen RNA eingesetzt wurde, eine Probe bei der RNA durch RNase verdaut worden war und in der gleichen Menge in den Test eingesetzt wurde wie intakte RNA.

### **2.5.2 RNA in der Gerinnung**

RNA wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zu Standard-Humanplasma gegeben und die Gerinnungszeit im Schnitger & Gross gemessen. Desweiteren wurde im turbidometrischen Test der Einfluß von 100 µg/ml RNA auf unterschiedliche Konzentrationen Kaolin und auf unterschiedliche Verdünnungen der TF Reagenz Neothromtin untersucht. Ebenso wurden unterschiedliche Mangelplasmen wie FXII-, FVIII- und Prekallikrein-Mangelplasma mit RNA inkubiert und die Gerinnung im KC4 Koagulations-Zeitnehmer gemessen.

### **2.5.3 RNA und Prekallikrein**

In einem *in vitro*-Test wurden in einer 96-well Mikrotiterplatte 20 nM Prekallikrein, 20 nM HMW-Kininogen oder beide Substanzen zusammen in 1 % (wt/vol) BSA in HBS verdünnt und mit 1 µg/ml RNA, 1 µg/ml RNA mit 10 ng/ml RNaseA oder ohne zusätzliche Substanzen versetzt. Anschließend wurden 10 µl des Kallikrein-Substrates S-2302 zugegeben und die Absorption der Lösungen wurde bei 405 nm für 60 min bei 37°C jede Minute gemessen.

## 2.6 Materialien

### 2.6.1 Geräte

	<b>Gerätename</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
8-well-Objektträger	8-well-chamber slide	<i>Labtek</i>	Naperville (IL)
Casy1-Counter	Casy1-Counter	<i>Schärfe-Systems</i>	Reutlingen
Dialyse-Schlauch	Dialyse-Schlauch	<i>Amicon</i>	München
Fluoreszenz-Mikroskop	Fluoreszenz-Mikroskop	<i>Leica</i>	Wetzlar
Gel-Doc-System	Gel-Doc	<i>BioRad</i>	München
Migrations-Membran	Migrations-Membran (8 µm Poren)	<i>Nucleopore</i>	Maidstone (UK)
Mikrotiterplatten	96-well Mikrotiterplatten	<i>Nunc</i>	Wiesbaden
MonoQ-Säule	MonoQ HR 10/10	<i>Amersham Pharmacia</i>	Freiburg
Nitrocellulose-Membran	Nitrocellulose-Membran	<i>Invitrogen</i>	Groningen
PD10-Säule	PD10	<i>Amersham Pharmacia</i>	Freiburg
Petrischalen		<i>Nunc</i>	Wiesbaden
Plättchen-Aggregometer	Chrono-Log Aggregometer	<i>Nobis</i>	Endingen
PVDF-Membran	Polyvinyliden-difluorid-Membran, Hybond P	<i>Amersham Pharmacia</i>	Freiburg
Superose6	Superose6 HR 10/30	<i>Amersham Pharmacia</i>	Freiburg
Überdruck-Ankonzentrator	Überdruck-Ankonzentrator	<i>Amicon</i>	München
Zentrifugations-konzentrator	VivaSpin Plus 10.000	<i>VivaScience</i>	Hannover

### 2.6.2 Kommerzielle Kits

	<b>Kit-Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
Apoptose-kit	In situ cell death detection kit	<i>Roche Diagnostics</i>	Mannheim
BrDU-Proliferations-Test	Cell proliferation ELISA, BrDU	<i>Roche Diagnostics</i>	Mannheim
Coomassie-Blau	Coomassie blue staining kit	<i>Invitrogen</i>	Groningen
ECL-Plus	ECL-Plus	<i>Amersham Pharmacia</i>	Freiburg
IEF-Gele	Isoelectric focussing kit	<i>Invitrogen</i>	Groningen



	<b>Kit-Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
Immuno-Blot für Glykosilierungen	Immun-Blot kit for detection of glycoproteins	<i>BioRad</i>	München
N-Glycosidase F	Deglycosylation kit	<i>Roche Diagnostics</i>	Mannheim
NuPage & Tris/Glycin-Polyacrylamidgele	NuPage	<i>Invitrogen</i>	Groningen
RNeasy kit	RNeasy kit	<i>Qiagen</i>	Hilden
Silberfärbung	Silver staining kit	<i>Invitrogen</i>	Groningen
VectorPlus	Vector Plus	<i>Vector</i>	Mannheim

### 2.6.3 Puffer

#### Pufferzusammensetzung

Clotting Reagenz	4 Einheiten Thromborel S wurden mit 2 ml H <sub>2</sub> O rekonstituiert, von denen 1.5 ml benutzt wurde um 3 Einheiten Neothromtin zu rekonstituieren
Coating-Puffer	15 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 35 mM NaHCO <sub>3</sub> , pH 9,0
ELISA-Puffer	1 % BSA (wt/vol), 1 % Tween 20 (vol/vol), 0,15 M NaCl, 10 mM Na-Citrat pH 7,4
HBS	119 mM NaCl, 4 mM KCl, 11 mM Glucose, 20 mM HEPES, pH 7,4
HE-Puffer	0,2 M Arginin, 0,2 M Lysin, 0,3 M NaCl, 0,005 M Na-Citrat, pH 4,5
Imi-Puffer	0,1 M Imidazol
PBS	150 mM NaCl, 3 mM KCl, 9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Proben-Puffer	5 % Formamid, 0,5 % Xylen-Xyanol, 0,5 % Bromphenolblau
SDS-Proben-Puffer	5 % (wt/vol) SDS, 40 % Glyzerin (wt/vol), 0,5 % Bromphenolblau (wt/vol), 250 mM Tris, pH 6,8
TAE-Puffer	80 mM Tris, 5 mM Essigsäure, 10 mM Tris
TBS	150 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris, pH 7,4
TBST	150 mM NaCl, 3 mM KCl, 25 mM Tris, 0,1 % Tween 20 (wt/vol), pH 7,4
Tris-Glycin-Puffer	20 mM Tris, 150 mM Glycin

### 2.6.4 Antikörper

	<b>Antikörperbeschreibung</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
LRP-Antikörper	Maus-anti-LRP-Antikörper	<i>mit freundlicher Genehmigung v. W. März</i>	Frankfurt
mAb1189	Monoklonaler Maus-anti-FSAP-Antikörper, gegen die schwere Kette von FSAP	<i>Aventis Behring</i>	Marburg

	<b>Antikörperbeschreibung</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
mAb570	Monoklonaler Maus-anti-FSAP-Antikörper gegen FSAP, der die FSAP-Aktivität inhibiert	<i>Aventis Behring</i>	Marburg
mAb677	Monoklonaler Maus-anti-FSAP-Antikörper gegen die leichte Kette von FSAP	<i>Aventis Behring</i>	Marburg
mAb677-POD	Monoklonaler Maus-anti-FSAP-Antikörper gegen die leichte Kette von FSAP, POD-markiert	<i>Aventis Behring</i>	Marburg
MAPK 42/44-Antikörper	Maus-anti-MAPK 42/44-Antikörper	<i>New England Biolabs</i>	Frankfurt
MAPK p42/p44-Antikörper	Maus-anti-MAPK p42/p44-Antikörper	<i>New England Biolabs</i>	Frankfurt
pAb-K'	Polyklonaler Kanninchen-anti-FSAP-Antikörper	<i>Aventis Behring</i>	Marburg
PDGF-BB-Antikörper	Kanninchen-anti-PDGF-BB-Antikörper	<i>R&amp;D Systems</i>	Minneapolis (MN)
PDGF-BB-R-Antikörper	Maus-anti-PDGF-BB-Rezeptor-Antikörper	<i>Upstate</i>	Lake Placid (NY)
Phosphotyrosin-Antikörper	Maus-anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY20	<i>New England Biolabs</i>	Frankfurt
Schaf-anti-Maus-Antikörper	Schaf-anti-Maus-Antikörper, POD-gekoppelt	<i>BioRad</i>	München

### 2.6.5 Materialien

	<b>Beschreibung</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
β-Mercaptoethanol	β-Mercaptoethanol	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
<sup>125</sup> I-PDGF-BB	Platelet derived growth factor-BB, radioaktiv markiert mit <sup>125</sup> I	<i>Amersham Pharmacia</i>	Freiburg
Acrylamid	Acrylamid	<i>Roth</i>	Mannheim
Agarose	Agarose	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
Amphotercin	Amphotercin	<i>Promocell</i>	Heidelberg
Aprotinin	Antagosan®	<i>Roche</i>	Bern, Schweiz
BrCN-Sepharose	BrCN-Sepharose	<i>Amersham Pharmacia</i>	Freiburg
BSA	Bovine serum albumin	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
Butanol	Butanol	<i>Roth</i>	Mannheim
Crystal Violet	Crystal Violet	<i>Sigma</i>	Taufkirchen

	<b>Beschreibung</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland
DNase	DNase I	<i>Roche Diagnostics</i>	Mannheim
ECBM	Endothelzell Basalmedium	<i>Promocell</i>	Heidelberg
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
FCS	Fötales Kälberserum	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland.
FSAP-Mangelplasma	FSAP-Mangelplasma	<i>Aventis Behring</i>	Marburg
FVII	Faktor VII	<i>Haemochrom Diagnostica</i>	Essen
FVIII-Mangelplasma	FVIII-Mangelplasma	<i>Dade Behring</i>	Marburg
FXII-Mangelplasma	FXII-Mangelplasma	<i>Dade Behring</i>	Marburg
Gelatine	Gelatine	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
Gentamycin	Gentamycin	<i>Promocell</i>	Heidelberg
HAM-F12	Ham F 12 Medium	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland
hBFGF	Humaner basic fibroblast growth factor	<i>Promocell</i>	Heidelberg
Heparin	Liquemin <sup>®</sup>	<i>Roche</i>	Basel, Schweiz
HMW-Kininogen	High molecular weight kininogen	<i>American Diagnostica</i>	Pfungstadt
HSA	Humanes Serum-Albumin	<i>Aventis Behring</i>	Marburg
IMM	Iscove's modified medium	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland
Kollagen TypI	Kollagen TypI	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
L-Glutamin	L-Glutamin	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland
Magermilchpulver	Magermilchpulver	<i>Fluka</i>	Buchs
Na-Pyruvat	Na-Pyruvat	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland
Neothromtin	Mischung aus TF und Phospholipiden	<i>Dade Behring</i>	Marburg
PDGF-BB	Platelet derived growth factor-BB	<i>Genzyme</i>	Cambridge, MA
Penicillin	Penicillin	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland
PPACK	Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon	<i>Calbiochem</i>	Bad Soden
Prekallikrein	Prekallikrein	<i>Haemochrom Diagnostica</i>	Essen

	<b>Beschreibung</b>	<b>Firma</b>	<b>Firmensitz</b>
Prekallikrein-Mangelplasma	Prekallikrein-Mangelplasma	<i>Haemochrom Diagnostica</i>	Essen
RNA	RNA aus Torula-Hefe	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
RNase	RNase A	<i>Qiagen</i>	Hilden
S-2288	chromogenes Substrat für Serinproteasen	<i>Chromogenix</i>	Uppsala, Schweden
S-2302	chromogenes Substrat für Prekallikrein	<i>Chromogenix</i>	Uppsala, Schweden
S-2444	chromogenes Substrat für Urokinase	<i>Chromogenix</i>	Uppsala, Schweden
SBTI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
scuPA	Prourokinase	<i>mit freundlicher Genehmigung von Dr. Paques</i>	Aachen
Standard Humanplasma (SHP)	Pool-Plasma von mind. zehn gesunden unterschiedlichen Spendern	<i>Aventis Behring</i>	Marburg
Streptomycin	Streptomycin	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland
Thromborel S	Mischung aus Ellagsäure und Phospholipiden	<i>Dade Behring</i>	Marburg
TMB	Tetramethylbenzidin	<i>Pierce</i>	Rockford, IL
Trizol	Trizol LS	<i>Invitrogen</i>	Karlsruhe
Trypsin	Trypsin, HPLC-grade	<i>Sigma</i>	Taufkirchen
Trypsin-EDTA	Trypsin, EDTA	<i>Gibco-BRL</i>	Paisley, Schottland
Urokinase	Actosolv <sup>®</sup>	<i>Aventis Pharma</i>	Marburg

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Isolierung und Autoaktivierung der FSAP

KANNEMEIER, C., FEUSSNER, A., STOHR, H. A., WEISSE, J., PREISSNER, K. T. AND ROMISCH, J. (2001): "Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme." **Eur J Biochem** 268(13): 3789-96.

##### 3.1.1 Isolierung der FSAP aus Plasma

Durch eine Antikörper-Affinitätschromatographie (mAb-Chromatographie) konnte die FSAP aus humanem Plasma in der inaktiven Proenzym-Form (Einketten-FSAP) mit einer Ausbeute von 97 % isoliert werden (Tab. 3.1, Abb. 3.1). Durch den nächsten Schritt der FSAP-Isolierung, die Anionen-Austauschchromatographie (MonoQ-Chromatographie), sank die Gesamt-FSAP-Ausbeute auf 65 % des Ausgangsmaterials. Eine Silberfärbung nach SDS-PAGE des MonoQ-Eluates zeigte keinen signifikanten Verunreinigungen (nicht gezeigt). Der Gesamtproteingehalt (7,2 mg) und der FSAP-Gehalt (7,6 mg) im Eluat nach MonoQ-Chromatographie waren annähernd gleich, es wird daher angenommen, dass der Reinheitsgrad des Endproduktes mehr als 95 % betrug. Allerdings konnten im Durchfluß der MonoQ-Chromatographie nur 16,2 mg von 26.1 mg des Gesamtproteins und 0,4 mg von 11,4 mg der FSAP des MonoQ-Ausgangsmaterials festgestellt werden, während im Eluat der MonoQ-Chromatographie 7,6 mg FSAP des Ausgangsmaterials detektiert wurden, was in etwa dem Gesamtproteingehalt des MonoQ-Eluates entsprach. Aus diesen Daten ergibt sich eine Differenz von 2,7 mg Gesamtprotein, bzw. 3,8 mg der FSAP, die in nicht detektierbarer

Fraktion	Protein			FSAP			
	Vol. (ml)	Konz. (mg/ml)	Total (mg)	Konz. (PEU/ml)	(PEU)	(mg)*	Gehalt (%)
Plasma	1200	60,3	7200	0,815	978	11,7	100
mAb- Chromatographie	130	0,2	26,1	7,332	953	11,4	97
MonoQ-Durchfluss	200	0,08	16,2	0,172	34	0,4	4
MonoQ-Eluat	15	0,48	7,2	42,058	631	7,6	65

Tab. 3.1: **Gehalt der FSAP während der Aufreinigung von Einketten-FSAP aus Plasma.** Gesamtprotein wurde mittels der Bradford-Methode, der FSAP-Gehalt wurde mit Hilfe des FSAP-Antigen-Tests ermittelt. \*Der Gesamtproteingehalt in den FSAP-Präparationen wurde anhand der gemessenen FSAP-Antigen-Menge errechnet (1PEU=12 µg/ml).

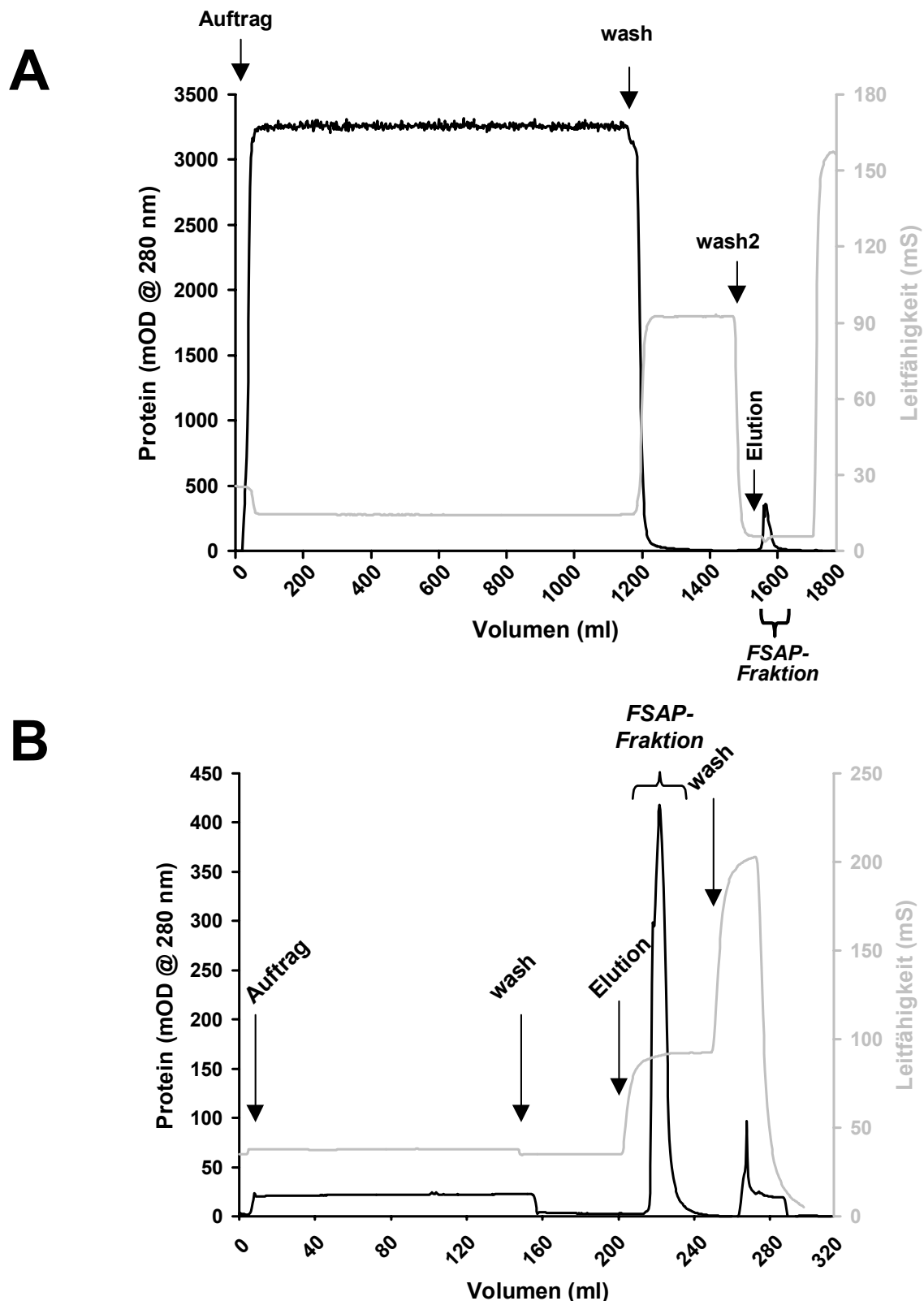


Abb. 3.1: Isolierung der Einketten-FSAP aus kryo-armen Plasma. (A) Plasma (1,2 L) wurde auf eine anti-FSAP-Antikörper-CNBr-Sepharose aufgetragen, gewaschen und mit einem sauren Glycin-Puffer eluiert. Die Proteinmenge wurde mittels eines Online-Photometers bei 280 nm (schwarze Kurve), die Leitfähigkeit mittels eines Online-Leitfähigkeitsmessers (graue Kurve) bestimmt. Die unterschiedlichen Isolierungsschritte (Auftrag, wash, Elution), sowie die Proteinfraction, die die FSAP enthält, sind angezeigt. (B) Das FSAP-haltige Eluat der Antikörper-Affinitäts-Chromatographie (130 ml) wurde bei pH 4,5, 0,3 M NaCl auf eine MonoQ-Säule aufgetragen, gewaschen und mit 1 M NaCl wieder eluiert. Die Proteinmenge wurde mittels eines Online-Photometers bei 280 nm bestimmt (schwarze Kurve), die Leitfähigkeit mittels eines Online-Leitfähigkeitsmessers (graue Kurve). Die unterschiedlichen Isolierungsschritte (Auftrag, wash, Elution), sowie die Proteinfraction, die die FSAP enthält, sind angezeigt.

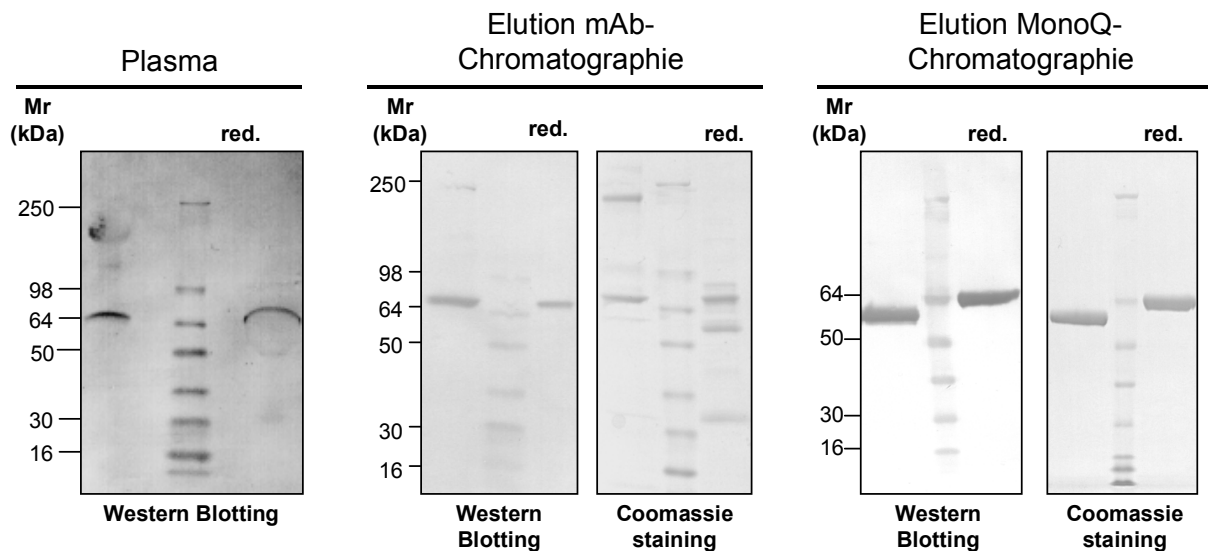


Abb. 3.2: **Aufreinigung von Einketten-FSAP aus Plasma.** 150  $\mu$ l Plasma oder 6  $\mu$ g der Eluate von mAb- und MonoQ-Chromatographie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde die FSAP durch Western-Blotting nachgewiesen oder alle Proteine durch Coomassie-Staining angefärbt. Das Molekulargewicht ist angezeigt, reduzierte Proben sind mit red. gekennzeichnet.

Weise während der MonoQ-Chromatographie verloren gegangen sind. Möglicherweise reichte die Ionenstärke von 1 M NaCl nicht aus, um die gesamte FSAP von der MonoQ-Säule zu trennen, und erst bei einer Ionenstärke von 2 M NaCl erfolgte eine Aufhebung der Bindung zwischen der FSAP und dem MonoQ-Material. Tatsächlich zeigt das MonoQ-Chromatogramm einen weiteren Proteinpeak nach dem Waschen der Säule mit 2 M NaCl. Durch Ankonzentrierung und anschließenden Austausch des Puffers gegen einen sauren, aminosäurehaltigen Puffer wurde die FSAP in eine stabile, lagerfähige Form überführt.

Ein Großteil des Proteins, dass während der mAb-Chromatographie miteluiert wurde, stellte sich im Coomassie-Färbung des Eluates als eine Bande mit einem Molekulargewicht von  $\approx 150$  kDa dar, die nach Reduzierung der Probe in kleinere Fragmente zerfiel (Abb. 3.2). Das ist ein erstes Indiz dafür, dass es sich bei diesem Protein um IgG handelt, da IgG nach Reduktion in seine Bestandteile, die  $F_{ab}$  und  $F_c$ -Teile, zerfällt. Diese Bande zeigte eine eindeutige Reaktivität nach Inkubation mit anti-Human-Antikörper im Western Blot (nicht gezeigt), es handelt sich daher höchstwahrscheinlich um menschliche Antikörper, die während der Aufreinigung an die mAb-Säule gebunden haben.

Ein Nachweis der Einketten-FSAP erfolgte im humanem Plasma, im Eluat der mAb-Chromatographie und im MonoQ-Eluat durch SDS-PAGE und anschließendes Western Blotting (Abb. 3.2). Eine vorübergehende Anhebung des pH-Wertes des MonoQ-Eluates nach Dialyse in HE-Puffer auf 6,0 resultierte in einer Aktivierung der Einketten-FSAP zu der Zweiketten-FSAP ohne signifikante Degradation (Abb. 3.3), während in der Abwesenheit des HE-Puffers unterschiedliche FSAP-Fragmente bei der gleichen Prozedur beobachtet wurden (nicht gezeigt).

Durch eine Proteinbestimmung des Endproduktes der FSAP-Präparation anhand der Kjeldahl-Methode kann durch die Ausbeute-Berechnung auf die FSAP-Konzentration im Plasma geschlossen werden. Die Einketten-FSAP zirkuliert mit einer Konzentration von 12 µg/ml im menschlichen Plasma, also entspricht 1 Plasma-äquivalente Einheit (PEU) 12 µg/ml der FSAP.

### 3.1.2 Charakterisierung der isolierten FSAP

Die Identität des isolierten Proteins bestätigte sich durch eine N-terminale Sequenzierung als FSAP. Die N-terminale Sequenz der 64 kDa-Bande lautet

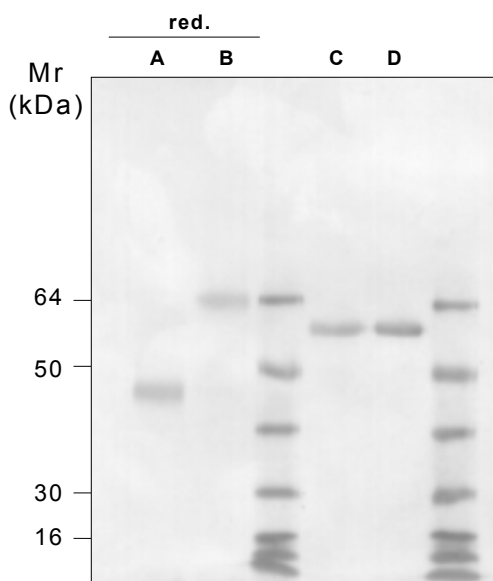


Abb. 3.4: Die schwere Kette der FSAP ist glykosiliert. Jeweils 4 µg einer Einketten- (B, D) und einer Zweiketten-FSAP-Präparation (A, C) wurden unter reduzierenden (A, B) und nicht reduzierenden Bedingungen einer SDS-PAGE und anschließendem Western Blotting unterzogen. Glykosilierungen wurden durch Reduktion der Kohlenhydrate und anschließender Biotinylierung sichtbar gemacht. Die Molekulargewichte sind angezeigt.

FMLSLLES LDP, die N-terminale Sequenz der 45 kDa-Bande FMLSLLES LDP und die der 28 kDa-Bande IYGGFKSTAGK. Die gefundenen Sequenzen stimmen mit dem N-terminalen Ende der schweren Kette der FSAP ohne Signalpeptid und dem N-terminalen Ende der leichten Kette der FSAP überein (s. Abb. 1.2). SDS-PAGE und Western Blotting zeigten ein Molekulargewicht der FSAP von 58-60 kDa unter nicht-reduzierenden Bedingungen und von 64 kDa unter reduzierenden Bedingungen (Abb. 3.1). In einer Größen-Ausschlußchromatographie wurde das Molekulargewicht von FSAP auf  $60 \pm 5$  kDa bestimmt (nicht gezeigt). Durch eine Reduktion der Kohlenhydrate und anschließender Biotinylierung der reduzierten Kohlenhydrate konnte FSAP als Glykoprotein dargestellt werden. Da nach SDS-Page und Western Blotting unter reduzierenden

Bedingungen nur die schwere Kette mit einer Glykofärbung detektiert werden konnte, befindet sich offensichtlich auf der schweren Kette von FSAP eine Glykosilierungsstelle (Abb. 3.4). Der isoelektrische Punkt von FSAP beträgt 4,9 – 5,5 (nicht gezeigt).



### 3.1.3 Aktivierung und Autoaktivierung der FSAP

Die aufgereinigte Einketten-FSAP zeigte bei Inkubation bei einem neutralen pH-Wert mit unterschiedlichen Reagenzien eine Autoaktivierung (Abb. 3.5). Sowohl die Aktivierung von scuPA als auch die direkte amidolytische Aktivität der FSAP zeigten ein Bild mit signifikanten Ähnlichkeiten. Während eine Inkubation bei neutralem pH-Wert ohne jegliche Zusätze zu einer Umwandlung der Einketten-FSAP zum aktiven Enzym und zum weiteren Abbau der leichten Kette führte, verzögerte sich die Autoaktivierung der Einketten-FSAP zur Zweiketten-FSAP durch geringe Mengen  $\text{Ca}^{2+}$  deutlich. Auch die Degradation der leichten Kette von FSAP, die die Serinproteasen-Domäne der FSAP enthält, verzögerte sich signifikant durch  $\text{Ca}^{2+}$ . Da die FSAP-Aktivität in der Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  bei geringeren Mengen Zweiketten-FSAP im Vergleich zur Probe ohne Zusätze höher war, kann davon ausgegangen werden, dass  $\text{Ca}^{2+}$  ein Cofaktor für die FSAP-Aktivität ist. Die Zugabe von Heparin führte im Gegensatz dazu zu einer hohen initialen FSAP-Aktivität und einer

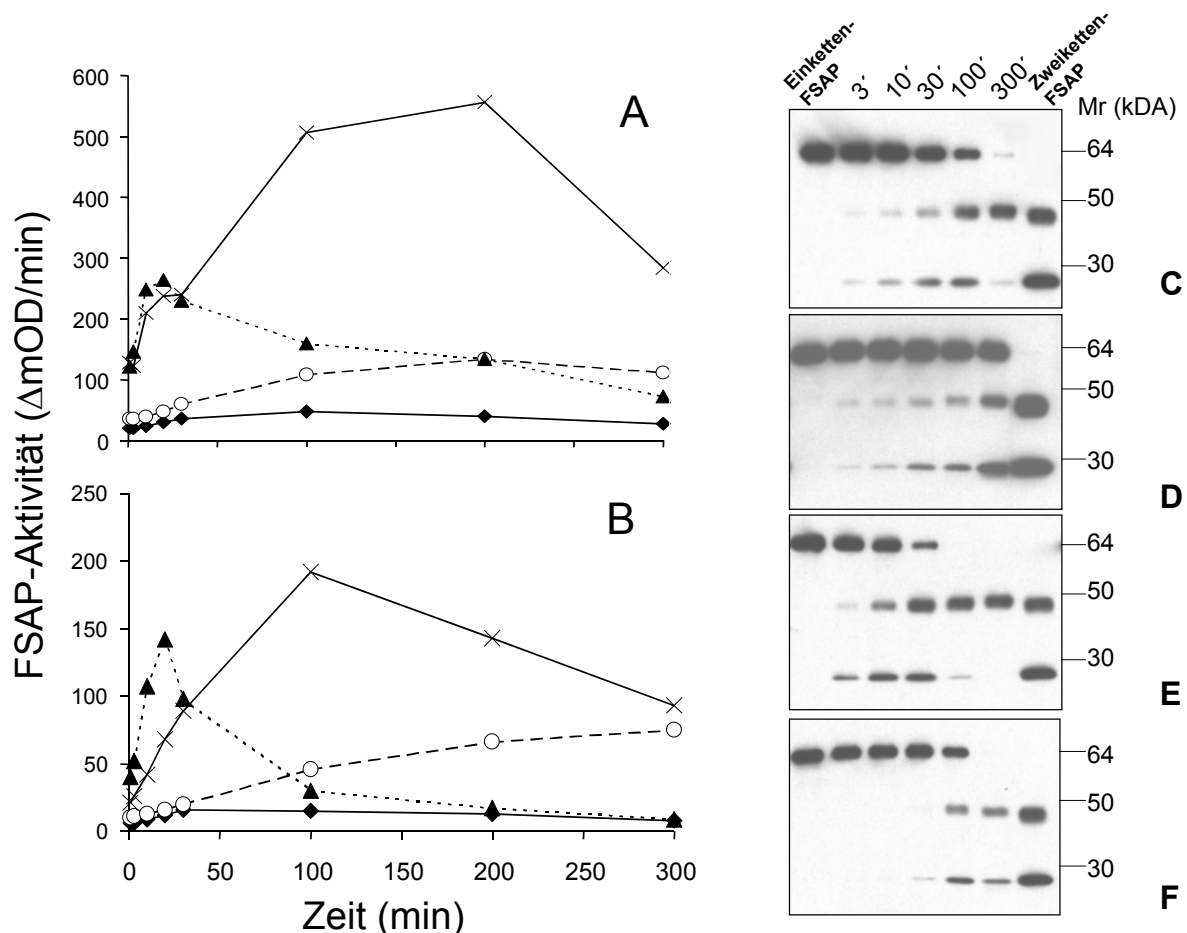
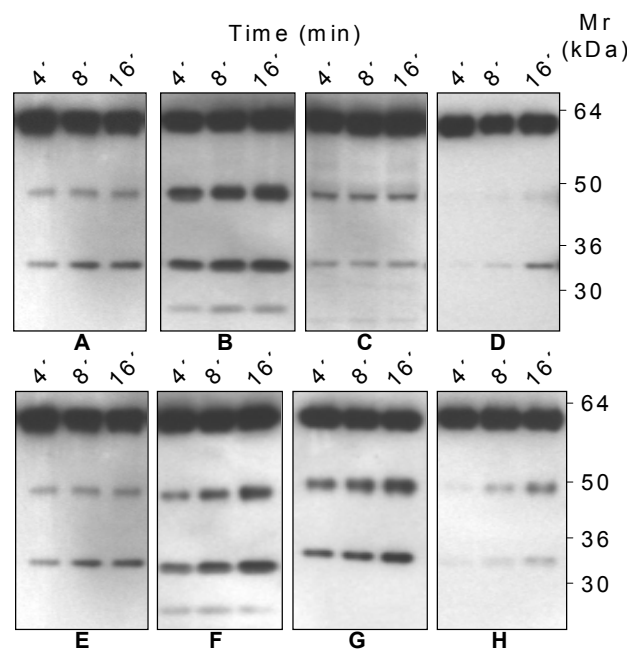


Abb. 3.5: **FSAP-Autoaktivierung.** Die Einketten-FSAP (1,2 μg/ml) wurde ohne Zusätze (◆, C), mit 3 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (○, D), mit 10 μg/ml Heparin (▲, E) oder mit Heparin und  $\text{Ca}^{2+}$  (X, F) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die FSAP-Aktivität entweder gegen 20 μg/ml scuPA und anschließender Detektion der scuPA-Aktivität gegen S-2444 (A), oder direkt gegen S-2288 (B) gemessen. Parallel dazu wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und mittels SDS-PAGE und Western Blotting geprüft, ob die FSAP in der inaktiven Einketten- oder der aktiven Zweiketten-Form vorlag (C – F). Die Molekulargewichte sind angezeigt.

schnelleren Aktivierung von Einketten- zu Zweiketten-FSAP als in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  alleine. Erwartungsgemäß wurde hier auch die leichte Kette der FSAP mit höherer Geschwindigkeit degradiert. Die gleichzeitige Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  und Heparin führte zu der höchsten FSAP-Aktivität über die längste Zeit hinweg. Auch die Aktivierung des Proenzym der FSAP konnte durch die gleichzeitige Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$  und Heparin, im Gegensatz zu Heparin alleine, signifikant verlängert werden. Ebenso verzögerte sich der Abbau der leichten Kette in diesem Experiment.  $\text{Ca}^{2+}$  ist also ein stabilisierender und aktivitätssteigernder Cofaktor für die FSAP, während Heparin die Autoaktivierung der Einketten-FSAP deutlich beschleunigt.

Die Zugabe von aktiven Enzymen der Gerinnungskaskade, so wie FXII, Kallikrein, FXI, FX, FIX, FVIII, FVII, FV, Thrombin, Plasmin und tPA führte nicht zu einer schnelleren Aktivierung der Einketten-FSAP im Vergleich zu einer Kontrolle ohne diese Substanzen. Alleine die Zugabe von scuPA verursachte eine schnellere, initiale Autoaktivierung der Einketten-FSAP zu Zweiketten-FSAP. Daraufhin wurden unterschiedliche uPA-Isoformen im Hinblick auf ihre Fähigkeit der Einketten-FSAP-Aktivierung

untersucht. Es zeigte sich, dass dieselben molaren Konzentrationen von scuPA, uPA und high molecular weight uPA, aber nicht eine inaktive Mutante von scuPA (scuPA-Gly158), low molecular weight uPA oder ATF die initiale Aktivierung der Einketten-FSAP in der Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  und Heparin beschleunigen konnten (Abb. 3.6). Die uPA-Isoformen in diesem Versuch lagen in einem 10fachen Überschuß zu FSAP vor und sobald die Konzentrationen der uPA-Isoformen im Verhältnis zu FSAP auf niedrigere Werte gesenkt wurden, konnte keine Aktivierung der Einketten-FSAP mehr beobachtet werden (nicht gezeigt).



**Abb. 3.6: Isoformen von uPA beschleunigen die FSAP-Autoaktivierung.** Die Einketten-FSAP (200nM) wurde entweder ohne jegliche Zusätze (A, E) oder mit jeweils 2  $\mu\text{M}$  scuPA (B), der enzymatisch inaktiven scuPA Mutante scuPA-Gly158 (C), ATF (D), high molecular mass uPA (F), uPA (G) oder low molecular mass uPA (H) inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden Proben entnommen und einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blotting unterzogen. Die Molekulargewichte sind angezeigt.

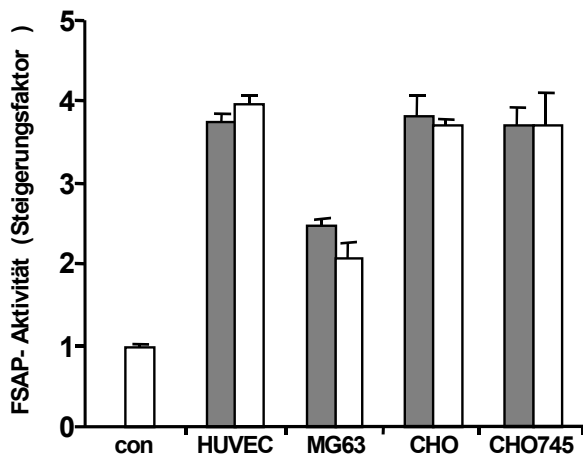


Abb. 3.7: **Zellen und konditioniertes Medium aktivieren die Einketten-FSAP.** Die Einketten-FSAP wurde mit humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC), Osteosarkomzellen (MG63), Hamsteroarzellen (CHO) und Hamsteroarzellen, die keine Glycosaminoglycane exprimieren (CHO745) (dunkle Säulen) oder mit konditioniertem Medium der jeweiligen Zelltypen (helle Säulen) inkubiert und die FSAP-Aktivität gegen S-2288 festgestellt. Die Aktivität wurde als Steigerung der Aktivität gegenüber einer Pufferkontrolle angegeben (con).

Abb. 3.6 zeigt nach Inkubation mit scuPA und high molecular mass uPA FSAP-Fragmente mit einer Größe von ca. 15 kDa, die in ihrer Funktion und Identität noch nicht aufgeklärt sind.

Um mögliche zelluläre Aktivatoren der Einketten-FSAP zu identifizieren, wurden unterschiedliche Zelltypen mit Einketten-FSAP inkubiert und die FSAP-Aktivität gemessen (Abb. 3.7). Es zeigte sich, dass alle getesteten Zelltypen in unterschiedlichem Ausmaß eine FSAP-Cofaktor-Aktivität besaßen und mit einer bis zu vierfachen Erhöhung der FSAP-Aktivität, im Vergleich zu einer Pufferkontrolle, in der Lage waren die

Einketten-FSAP zu aktivieren. Osteosarkomzellen, sowie humane VSMC (nicht gezeigt) zeigten nur eine halb so große Aktivierungsrate gegenüber Einketten-FSAP wie die anderen gemessenen Zelltypen. Konditioniertes Medium hatte den gleichen Effekt auf die FSAP-Aktivität wie die Zellen alleine. Weder das konditionierte Medium noch die Zellen alleine hatten detektierbare, amidolytische Aktivität. Es gibt also eine zelluläre Substanz, die Einketten-FSAP in seiner Autoaktivierung beschleunigt.

### 3.2 Identifikation von RNA als zellulärer Cofaktor für die Einketten-FSAP

NAKAZAWA, F., KANNEMEIER, C., TRUSHEIM, H. AND PREISSNER, K. T. (2003): "Activation of Factor VII activating protease by cell derived ribonucleotids." **In Vorbereitung.**

Um die Substanzklasse des zellulären FSAP-Cofaktors für die FSAP-Aktivität zu bestimmen, wurde das konditionierte Medium mit unterschiedlichen Methoden behandelt (Tab. 3.2). Weder ein Trypsin-Verdau, noch eine Hitze-Denaturierung, sowie Glycosidase-Verdau, Neuraminidase-Verdau, Lipid-Extraktion oder DNase-Behandlung verursachten eine signifikante Erniedrigung der FSAP-Aktivität. Einzig durch einen RNaseA-Verdau konnte die FSAP-Aktivität auf den Kontrollwert reduziert werden. Das ist ein erstes, deutliches Zeichen für eine Funktion von RNA als Cofaktor für die FSAP.

Klassifizierung	Behandlung des konditionierten Mediums	FSAP Aktivität
Protein	Proteaseinhibitoren	+++
	Hitzedenaturierung	+++
	Trypsin-Verdau	+++
Kohlenhydrate	Glycosidase-Verdau	++
	Neuraminidase-Verdau	++
Lipid	Butanol-Extraktion	+
	MtOH/Chloroform-Extraktion	+
Nukleinsäuren	DNase-Verdau (RQ)	++
	RNaseA-Verdau	-

Tab. 3.2: **RNaseA-Verdau verhindert die FSAP-Aktivierung in konditioniertem Medium.** Konditioniertes Medium von CHO745-Zellen wurde mit den angegebenen Substanzen behandelt, anschließend die FSAP-Aktivität gegen S-2288 gemessen und gegen eine Pufferkontrolle verglichen, die dieselben Substanzen enthielt. Die angegebenen Daten entsprechen dem Anstieg der FSAP-Aktivität gegenüber dem jeweiligen Kontrollpuffer.

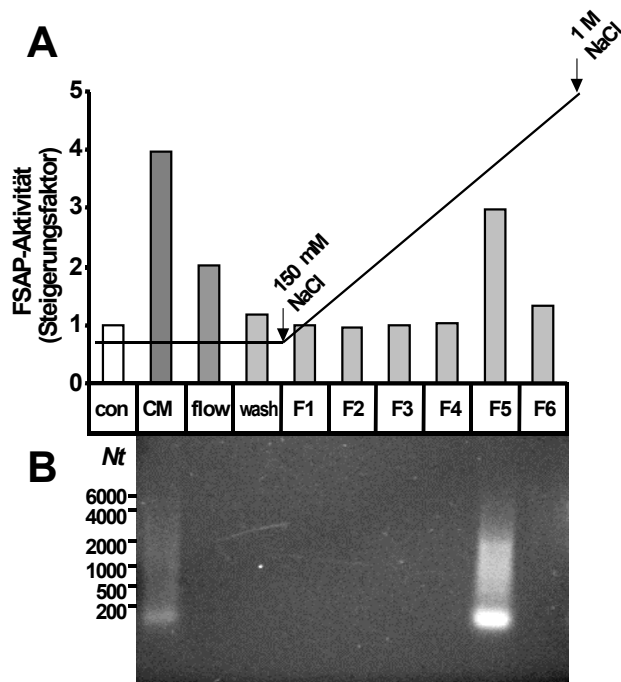


Abb. 3.8: **Isolierung von RNA aus konditioniertem Medium.** (A) Konditioniertes Medium von CHO745-Zellen (CM) wurde bei pH 9,0 mittels einer Anionen-Austauschchromatographie mit einem NaCl-Gradienten aufgetrennt und die einzelnen Fraktionen nach Umsalzen auf FSAP-Aktivität geprüft. Dargestellt ist der Steigerungsfaktor gegenüber der Pufferkontrolle. (B) Alle Fraktionen wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen und Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Nukleotidgrößen sind angezeigt (Nt).

Zur weiteren Bestätigung dieses Befundes wurde konditioniertes CHO-Zell-Medium durch eine Anionen-Austauschchromatographie fraktioniert und die unterschiedlichen Fraktionen auf FSAP-Aktivität nach Ankonzentrieren und Umsalzen getestet. Die Fraktion 5 (F5) hatte als einzige Fraktion einen deutlich aktivierenden Einfluß auf die Einketten-FSAP (Abb. 3.8). F5 wurde sowohl mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung (nicht gezeigt) als auch auf einem 1 % Agarose-Gel mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung dargestellt. Eine deutliche Bande von Nukleinsäuren wurde in F5 im Agarose-Gel gefunden, während eine Silberfärbung nach SDS-PAGE nur eine unspezifische Schwarzfärbung über das gesamte Größenspektrum des Gels hervorbrachte, das nach RNase-Behandlung

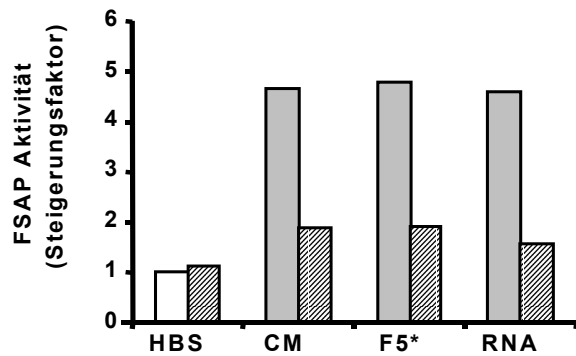


Abb. 3.9: **RNA aktiviert die FSAP.** Konditioniertes Medium (CM), Fraktion 5 (F5) und isolierte RNA (RNA, jeweils 10 µg/ml RNA) wurden mit (gestreifte Säulen) und ohne (einfarbige Säulen) RNaseA-Vorbehandlung mit der Einketten-FSAP inkubiert und die FSAP-Aktivität festgestellt. Dargestellt ist die Steigerung gegenüber der Pufferkontrolle.

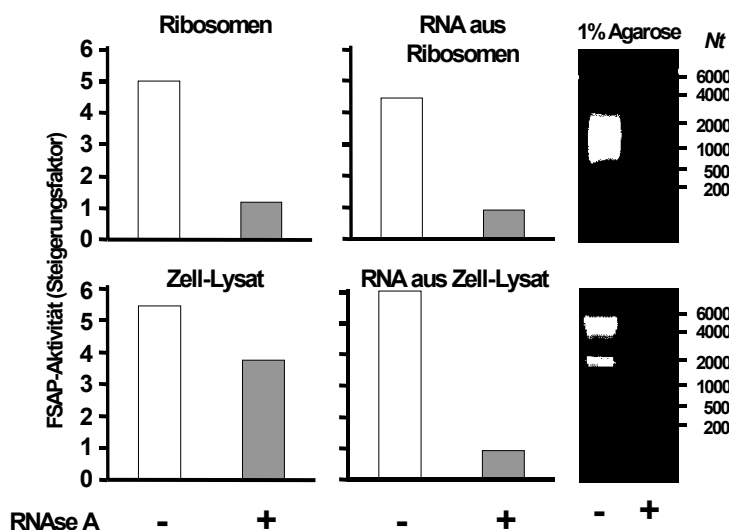


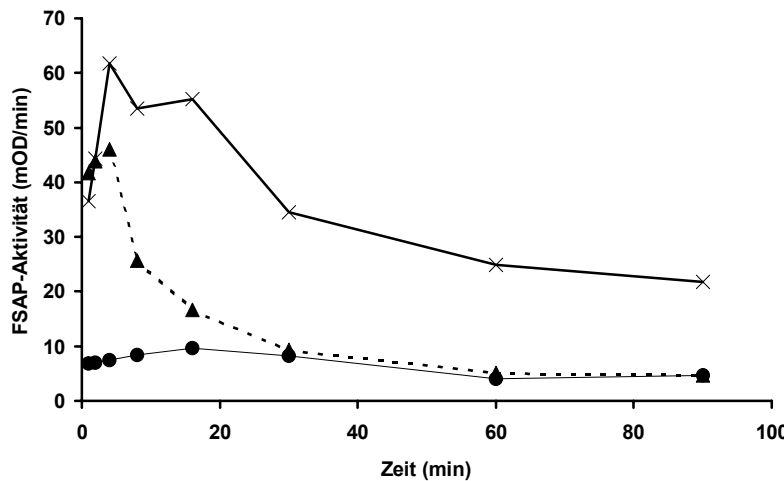
Abb. 3.10: **RNA aus Ribosomen und Zell-Lysat aktiviert FSAP.** Ribosomen und Zell-Lysat wurden in der Gegenwart (dunkle Säulen) und Abwesenheit von RNaseA (helle Säulen) hergestellt und anschließend von den zwei Präparationen die RNA isoliert. Von allen Präparationen wurde die FSAP-Aktivität gemessen. Dargestellt ist die Aktivitätssteigerung gegenüber dem jeweiligen Kontrollpuffer. Die isolierte RNA wurde auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen und Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

von F5 verschwand (nicht gezeigt). Eine RNase Behandlung des konditionierten Mediums, der F5 und isolierter RNA führte in allen Fällen zu einer Reduktion der FSAP-Aktivität nahe dem Kontrollwert (Abb. 3.9). RNA ist also im konditioniertem Medium vorhanden und ebenso wie isolierte RNA dafür verantwortlich, dass die Einketten-FSAP in ihrer Autoaktivierung beschleunigt wird.

Desweiteren wurde RNA sowohl aus Zellen als auch aus Ribosomen isoliert und auf eine FSAP-Cofaktor-Aktivität hin überprüft. Ein Zelllysate brachte eine FSAP-Aktivitätserhöhung hervor, die nicht durch RNase-Behandlung verhindert werden konnte, während eine RNase-Behandlung die durch Ribosomen verursachte FSAP-Aktivität ebenso wie die FSAP-Aktivität der aus Zellen und Ribosomen isolierter RNA verhinderte (Abb. 3.10). Dass tatsächlich Nukleinsäuren in den

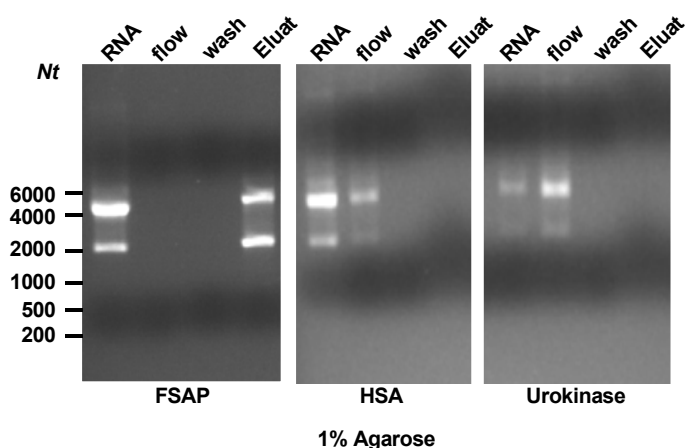
einzelnen Fraktionen vorhanden waren, wurde durch ein 1 %iges Agarose-Gel mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung bestätigt. RNase alleine hatte keinen Einfluß auf FSAP, weder aktivitätssteigernd noch inhibierend.

In dem FSAP-Aktivitäts-Test aus Abb. 3.7 führte RNA zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung von Einketten-FSAP (Abb. 3.11). Desweiteren hatte  $\text{Ca}^{2+}$  wiederum einen aktivitätsstabilisierenden Effekt auf FSAP. Diese Befunde deuten auf eine Heparin-ähnliche Rolle von RNA im Bezug auf die Einketten-FSAP-Autoaktivierung hin.

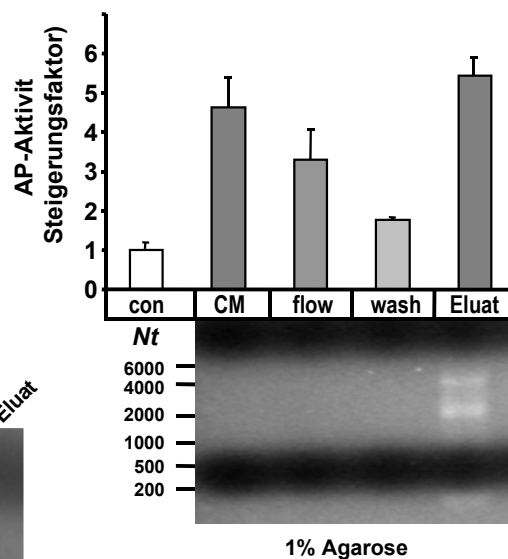


**Abb. 3.11: RNA fördert die Einketten-FSAP-Autoaktivierung.** Die Einketten-FSAP (1,2 µg/ml) wurde ohne Zusätze (●) mit 1 µg/ml Hefe-RNA (▲) und mit 1 µg/ml Hefe-RNA und 5 mM Ca<sup>2+</sup> (X) inkubiert und nach den angegebenen Zeitpunkten die FSAP-Aktivität gegen S-2288 gemessen.

Eine FSAP-Affinitätschromatographie bewies eine Interaktion zwischen FSAP und RNA. Isolierte RNA band an immobilisiertes, PPACK-inhibiertes Zweiketten-FSAP, aber nicht an immobilisiertes, PPACK-inhibiertes uPA oder immobilisiertes Albumin (Abb. 3.12). Durch eine Elution mit 2 M NaCl konnte RNA von der FSAP-Säule eluiert werden, während in den Kontrollen die Detektion von RNA im Durchlauf erfolgte. Die gleiche FSAP-Affinitätschromatographie mit konditioniertem Medium als Ausgangsmaterial zeigte zusätzlich eine Bindung zwischen RNA und der FSAP. Die FSAP-Aktivität im Eluat der FSAP-Affinitätschromatographie war nach dem Umsalzen ebenso hoch wie im



**Abb. 3.12: RNA bindet an die FSAP.** Die FSAP, HSA und uPA wurden jeweils mit PPACK vorbehandelt und anschließend an BrCN-Sepharose gekoppelt. Isolierte RNA wurde mit jeder Sepharose inkubiert, die Sepharose gewaschen und mit 2 M NaCl eluiert. Alle Fraktionen wurden um das 10fache ankonzentriert und auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen und die Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Nukleotidgrößen sind angezeigt.



**Abb. 3.13: RNA aus konditioniertem Medium bindet an die FSAP.** BrCN-immobilisiertes, PPACK-inhibierte FSAP wurde mit konditioniertem Medium inkubiert, gewaschen und alle gebundenen Substanzen mit 2 M NaCl von der Sepharose eluiert. Alle Fraktionen wurden um den gleichen Faktor ankonzentriert, umgesalzen und eine Hälfte auf ein 1 %iges Agarose-Gel aufgetragen und alle Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht, während die andere Hälfte dem Standard-FSAP-Aktivitätstest unterzogen wurde. Dargestellt ist die Aktivitätssteigerung der FSAP gegenüber dem Kontrollpuffer.

konditionierten Medium selber, während die anderen Fraktionen nur schwache oder gar keinen Unterschied in der FSAP-Aktivierung im Gegensatz zu Kontrollpuffer zeigten.

Durch diese Ergebnisse wurde deutlich bewiesen, dass RNA und die FSAP interagieren können, und dass die FSAP durch die Interaktion mit RNA in ihrer Autoaktivierung unterstützt wird.

### 3.3 Zelluläre Eigenschaften der FSAP

KANNEMEIER, C., RÖMISCH, J., PREISSNER, K. T. AND KANSE, S. M. (2003): "Factor VII activating protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell proliferation and migration of vascular smooth muscle cells." **Im Review-Prozess.**

#### 3.3.1 Die FSAP inhibiert die PDGF-BB-vermittelte Proliferation und Migration von humanen glatten Gefäßmuskelzellen (humane VSMC)

In einem Proliferationsexperiment, das auf der Bestimmung der Zellzahl basierte, wurden humane VSMC mit PDGF-BB stimuliert. Erwartungsgemäß stieg die Zellzahl der humanen VSMC nach PDGF-BB-Stimulierung an, nach Zugabe der Zweiketten-FSAP aber sank die Zellzahl der PDGF-BB-stimulierten Zellen wieder auf die Zellzahl der unbehandelten Proben ab (Abb.

3.14). Die Zweiketten-FSAP hatte keinen Einfluß auf die Proliferation

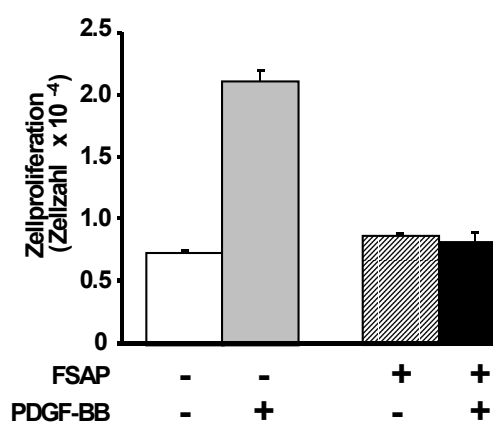


Abb. 3.14: FSAP inhibiert die PDGF-BB-vermittelte Proliferation von humanen VSMC. Die Zweiketten-FSAP (12 µg/ml) wurde für 5 Tage mit  $1 \times 10^4$  humanen VSMC in der Ab- und Anwesenheit von 20 ng/ml PDGF-BB inkubiert. Nach 3 Tagen Inkubation wurde das Medium gegen frisches Medium inklusive aller Reagenzien ausgetauscht und die Zellzahl jeder Probe bestimmt.

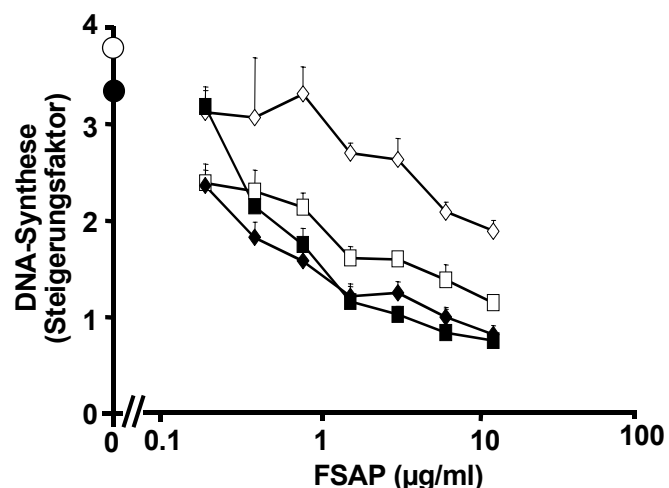
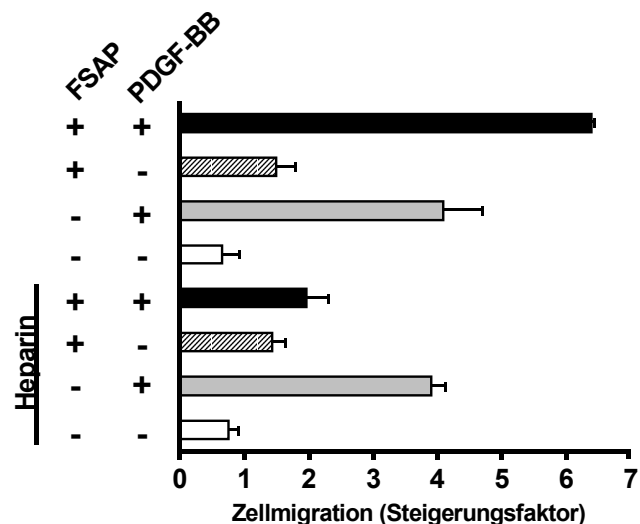


Abb. 3.15: Heparin verstärkt die Inhibition der PDGF-BB-vermittelten Proliferation der Ein- und Zweiketten-FSAP. PDGF-BB (20 ng/ml) und die Ein- (◇) und Zweiketten-FSAP (□) wurden in den angegebenen Konzentrationen mit  $1 \times 10^4$  humanen VSMC mit (schwarze Zeichen) und ohne (weiße Zeichen) 10 µg/ml Heparin inkubiert. Die Proliferation mit und ohne Heparin mit 20 ng/ml PDGF-BB ist auf der y-Achse als Kreis dargestellt. Dargestellt ist der Steigerungsfaktor der DNA-Synthese im Vergleich zu unbehandelten Zellen, deren Steigerungsfaktor 1 ist.

von Zellen, die nicht mit PDGF-BB stimuliert wurden. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die FSAP die PDGF-BB-stimulierte Proliferation von humanen VSMC inhibiert, aber die basale Zellproliferation nicht zu stören vermag.

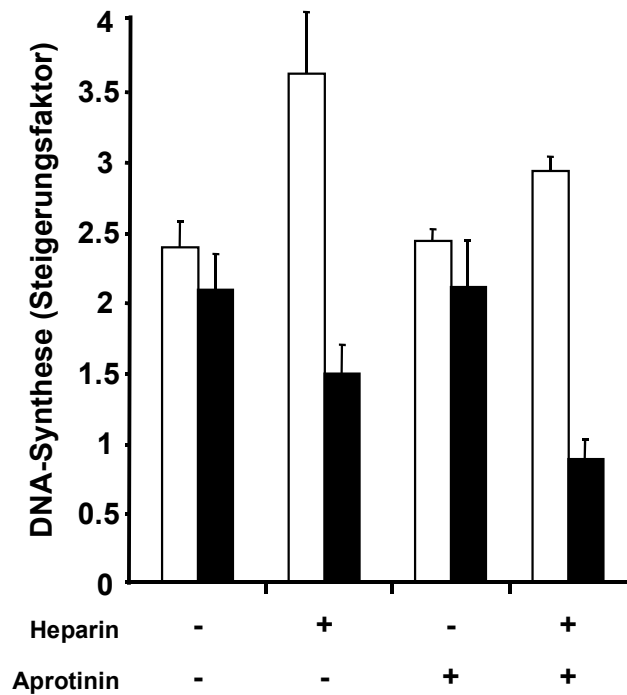
In einem DNA-Synthese Experiment hemmten die Zwei- und Einketten-FSAP beide die PDGF-BB-vermittelte Proliferation in konzentrationsabhängiger Weise, wobei Zweiketten-FSAP die Proliferation von humanen VSMC in höherem Ausmaß hemmen konnte als Einketten-FSAP (Abb. 3.15). Durch die Zugabe von Heparin wird die inhibierende Aktivität der Zwei- und Einketten-FSAP verstärkt so dass beide Formen der FSAP in ihrer Wirkung auf die Proliferation nicht mehr unterschiedlich sind. Auch in diesem Test wurde die unstimulierte Proliferation humaner VSMC nicht durch die FSAP verändert. Die Serinproteasen-Aktivität der FSAP scheint also die Proliferation von VSMC zu inhibieren. Desweiteren kann Heparin die FSAP-vermittelte Inhibition der PDGF-BB-induzierten Proliferation von VSMC, insbesondere der Einketten-FSAP, verstärken.

Um des weiteren zu prüfen, ob nicht nur die Proliferation sondern auch die Migration von VSMC durch die FSAP beeinflusst wird, wurden die gleichen Ansätze wie in den Proliferationsexperimenten auch für die Migration getestet. In der Abwesenheit von Heparin inhibierte die Zweiketten-FSAP die PDGF-BB-vermittelte Migration von murinen glatten Gefäßmuskelzellen (murine VSMC) nicht. Im Gegenteil, eine leichte Stimulation der Migration war zu verzeichnen, sowohl bei der Zugabe der FSAP alleine, als auch in der Anwesenheit von PDGF-BB (Abb. 3.16). Sobald allerdings Heparin und die Zweiketten-FSAP während der Migration anwesend waren, kam es zu einer Inhibition der PDGF-BB-vermittelten Migration, wobei die mitogene Antwort der Zellen im Vergleich zu den Proben ohne Heparin unverändert blieb. Die PDGF-BB-vermittelte Migration wurde durch FSAP in der Anwesenheit von Heparin jedoch nicht auf den Basalwert erniedrigt, sondern erreichte in etwa den Wert der milden FSAP-stimulierten



**Abb. 3.16: Die FSAP inhibiert PDGF-BB-vermittelte Migration in der Anwesenheit von Heparin.** Humane VSMC ( $2,5 \times 10^4$ ) wurden ohne jegliche Zusätze, 20 ng/ml PDGF-BB, 12  $\mu$ g/ml der Zweiketten-FSAP oder mit PDGF-BB und Zweiketten-FSAP in der An- und Abwesenheit von 10  $\mu$ g/ml Heparin wie angegeben inkubiert und die Migration in einer modifizierten Boyden-chamber beobachtet. Angegeben ist die Steigerungsrate der Migration im Vergleich zu unbehandelten Zellen.





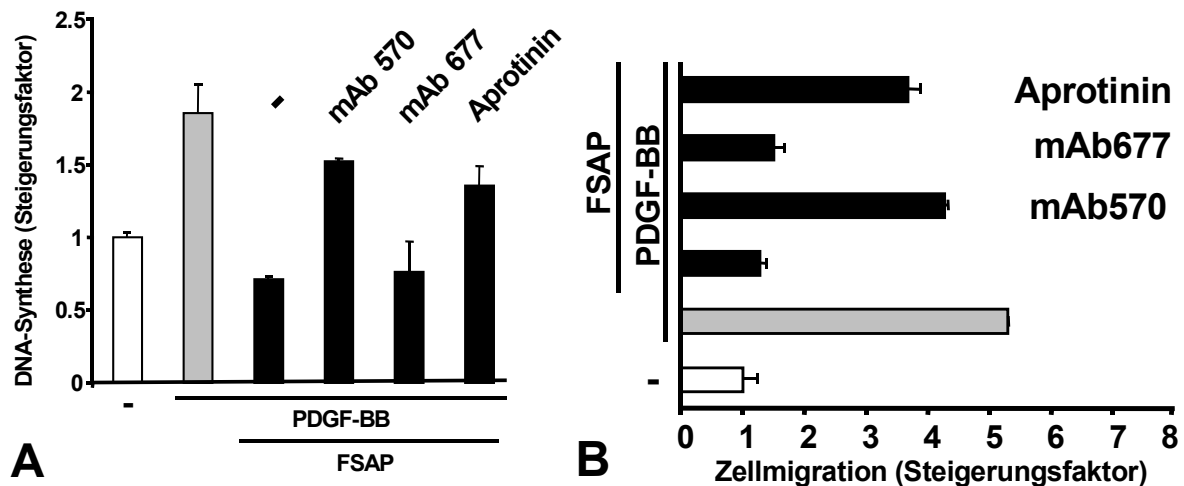
**Abb 3.17: Die FSAP verändert die mitogene Aktivität des PDGF-BB Moleküls.** PDGF-BB (20 ng/ml) wurde mit (schwarze Säulen) oder ohne (weiße Säulen) 12 µg/ml der Zweiketten-FSAP und mit und ohne 10 µg/ml Heparin wie angezeigt für 24 h vorinkubiert und anschließend entweder für 1 h mit 50 u/ml Aprotinin wie angezeigt inkubiert oder ohne weitere Behandlung zu dem DNA-Synthese Test hinzugefügt. Angegeben ist die Steigerungsrate der Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Migration. Nur die FSAP und Heparin zusammen können die PDGF-BB-vermittelte Migration von humanen VSMC hemmen.

Eine 24stündige Vorinkubation von PDGF-BB und der FSAP in der An- und Abwesenheit von Heparin mit anschließendem DNA-Synthese Test von humanen VSMC zeigte, dass die FSAP keinen Einfluß auf die DNA-Synthese von humanen VSMC nach Vorinkubation mit PDGF-BB ohne Heparin hatte. Ein deutlicher, inhibitorischer Effekt auf die Proliferation zeigte sich, sobald Heparin und die FSAP während der Vorinkubation anwesend waren (Abb. 3.17). Der mitogene PDGF-BB Effekt auf humane VSMC verstärkte sich durch

eine Vorinkubation mit Heparin und die Zellen proliferierten in höherem Masse als ohne Heparin. Um den DNA-Synthese Tests ohne die enzymatische Aktivität der FSAP durchführen zu können, wurde nach der Vorinkubation der FSAP und PDGF-BB mit und ohne Heparin eine zweite, einstündige Inkubation mit Aprotinin angeschlossen. Die Anwesenheit von Aprotinin veränderte das Muster der Proliferation nicht. Wieder kam es zu einer Inhibition der PDGF-BB Wirkung auf humane VSMC, wenn die FSAP und PDGF-BB zusammen mit Heparin vorinkubiert wurden. Daraus kann geschlossen werden, dass es durch die Vorinkubation der FSAP, PDGF-BB und Heparin zu einer inhibierenden Wirkung auf PDGF-BB kommt.

Um die Notwendigkeit der Serinproteasen-Aktivität der FSAP für die Inhibition der PDGF-BB-vermittelten Proliferation von humanen VSMC, als auch bei der PDGF-BB-vermittelten Migration von murinen VSMC jeweils in Anwesenheit von Heparin zu untersuchen, wurden unterschiedliche Inhibitoren der FSAP-Aktivität zu den Versuchsansätzen gegeben. Sowohl bei der Proliferation als auch bei der Migration konnte der inhibitorische Effekt der FSAP durch die Zugabe eines anti-FSAP-mAb, der die



**Abb 3.18: Die Serinprotease-Aktivität der FSAP ist wichtig für die Inhibition von Proliferation und Migration.** Die Proliferation von  $1 \times 10^4$  humanen VSMC (A) oder die Migration von  $2,5 \times 10^4$  murinen VSMC (B) wurde in der Gegenwart von 20 ng/ml PDGF-BB, 10 µg/ml Heparin und 12 µg/ml der Zweiketten-FSAP wie angezeigt ohne jegliche Zusätze (-), 50 µg/ml eines anti-FSAP-mAb, der die FSAP-Aktivität blockiert (mAb570), 50 µg/ml eines anti-FSAP-mAb, der die FSAP-Aktivität nicht blockiert (mAb677) oder 50 U/ml Aprotinin gemessen. Angegeben ist der Steigerungsfaktor gegenüber unstimulierten Zellen.

funktionelle Aktivität von FSAP blockiert, aufgehoben werden (Abb. 3.18). Ein anti-FSAP-mAb, der die Funktion der FSAP nicht inhibiert, konnte auch die inhibierende Wirkung der FSAP nicht aufheben. Ebenso konnte ein anderer FSAP-Inhibitor, Aprotinin, gegen die antiproliferativen und antimigratorischen Eigenschaften der Zweiketten-FSAP wirken.

Während der Untersuchung weiterer Zelltypen und Wachstumsfaktoren im Hinblick auf ihre Reaktion mit der FSAP stellte sich heraus, dass die FSAP die PDGF-BB und IGF1-vermittelte Proliferation von humanen VSMC und Osteosarkomzellen (MG63) inhibieren konnte, nicht aber die FCS-stimulierte Proliferation (Tab. 3.3). Auch die basale Proliferation dieser Zelltypen wurde nicht durch die FSAP gestört. Allerdings hatte die FSAP keinen Einfluß auf die VEGF-vermittelte Proliferation von humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC). Es kann also eher eine growth factor spezifische Wirkung der FSAP als eine zellspezifische Wirkung postuliert werden.

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, dass die FSAP die PDGF-BB-vermittelte Proliferation inhibieren kann und dass Heparin diesen Effekt verstärkt. Im Gegensatz dazu kann die FSAP die Migration von VSMC nur in der Anwesenheit von Heparin inhibieren, ohne Heparin kommt es zu einer leichten Aktivierung der Migration durch die FSAP.

Zelltyp	humane VSMC		MG63		HUVEC	
FSAP	+	-	+	-	+	-
kein Stimulus	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
FCS	3,1 ± 0,1	2,8 ± 0,3	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,8 ± 0,3
IGF-1	1,2 ± 0,2	2,1 ± 0,4	1,6 ± 0,2	2,3 ± 0,1	n.d.	
PDGF-BB	1,1 ± 0,2	3,9 ± 0,6	1,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1	n.d.	
VEGF	n.d.		n.d.		1,8 ± 0,1	2,1 ± 0,2

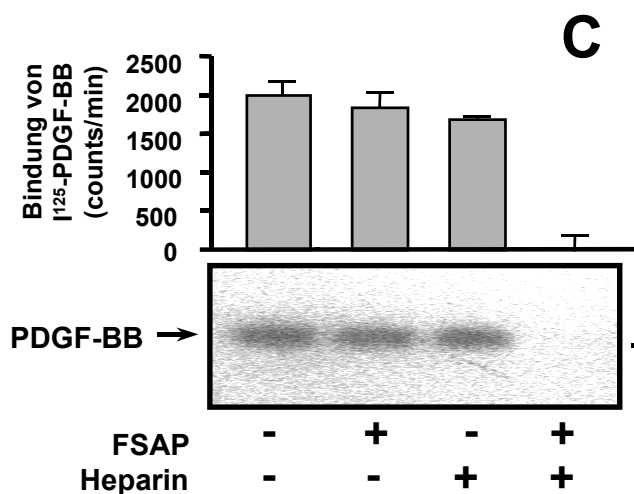
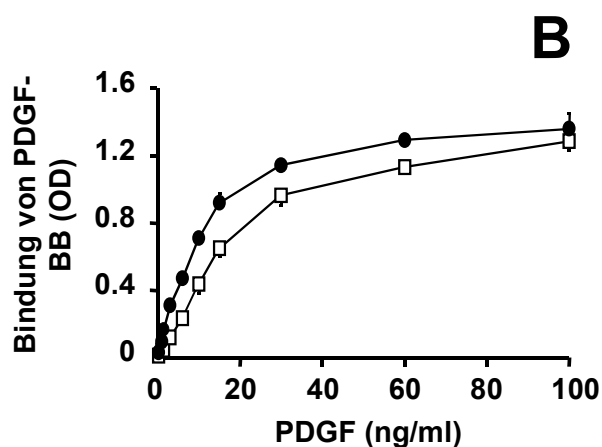
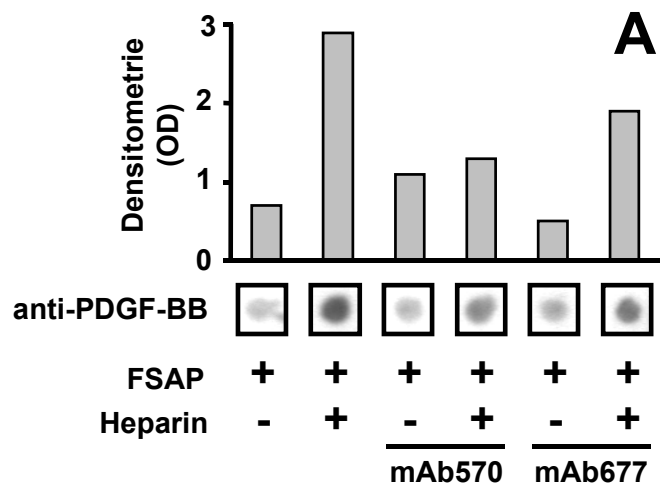
Tab. 3.3: **PDGF-BB und IGF-1-vermittelte Proliferation wird durch die FSAP inhibiert.** Humane VSMC ( $1 \times 10^4$ ),  $1 \times 10^4$  Osteosarkomzellen (MG-63) oder  $0,5 \times 10^4$  humane Nabelschnurendothelzellen wurden ohne jeden Stimulus, mit 5 % FCS, 20 ng/ml IGF-1, 20 ng/ml PDGF-BB oder 20 ng/ml VEGF mit 10 µg/ml Heparin mit (+) und ohne (-) 12 µg/ml der Zweiketten-FSAP inkubiert und die DNA-Synthese gemessen. Dargestellt ist der Steigerungsfaktor der Proliferation. Die Standardabweichung ist angegeben. n.d.: nicht gemacht.

### 3.3.2 Die FSAP inhibiert das PDGF-BB-induzierte Signal in VSMC durch die Inhibition der Bindung von PDGF-BB an die Zelloberfläche

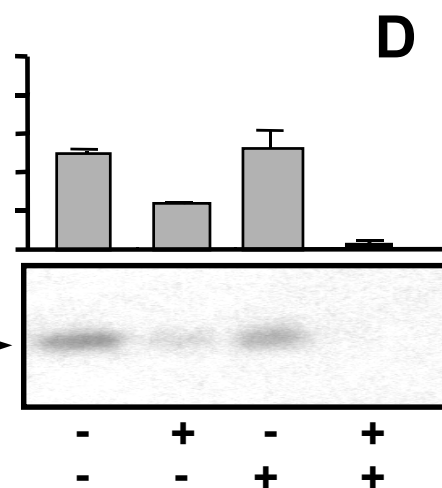
Ein Bindungsexperiment zeigte, dass PDGF-BB an immobilisierte FSAP sowohl in einem Dot-Blot Experiment als auch in einem ELISA in konzentrationsabhängiger Weise band (Abb. 3.19). In beiden Fällen erhöhte Heparin die Bindung von PDGF-BB an die FSAP. Die Bindung von PDGF-BB an die FSAP konnte nur teilweise durch einen inhibitorischen anti-FSAP-mAb (mAb570) inhibiert werden. Die Interaktion zwischen PDGF-BB und der FSAP ist dementsprechend nicht abhängig von der enzymatischen Aktivität der FSAP.

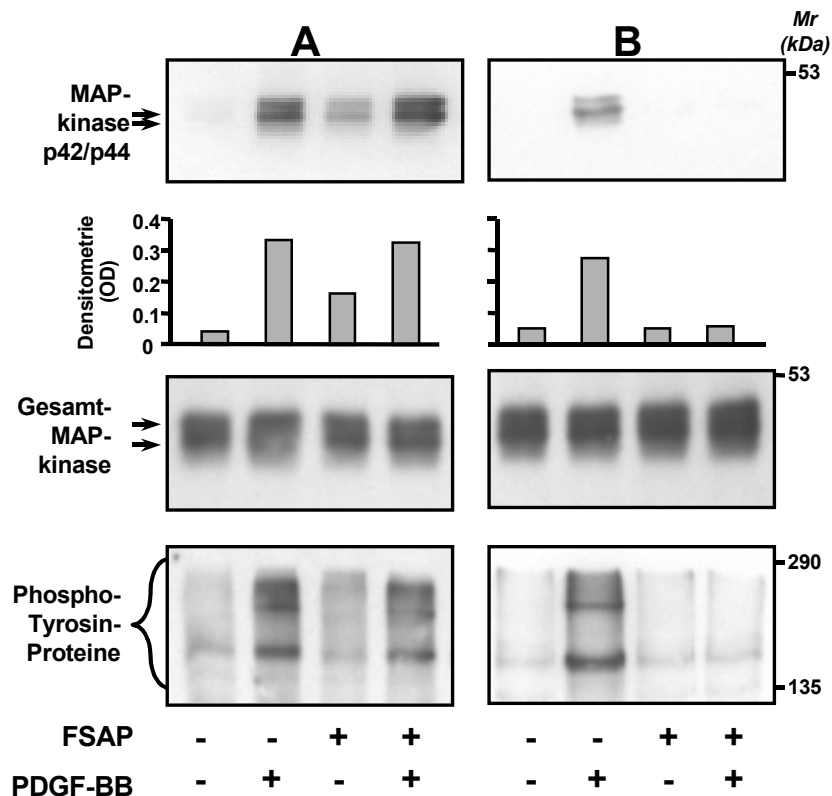
Da diese Bindungseigenschaften der FSAP und PDGF-BB auch die Ligand-Rezeptor-Interaktion von PDGF-BB und seinem Rezeptor an der Zelloberfläche stören könnten, wurde  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB auf humanen VSMC inkubiert und die Radioaktivität der Zellen anschließend quantifiziert. PDGF-BB band mit hoher Affinität an humane VSMC. Weder die FSAP noch Heparin konnten diese Bindung stören. Sobald allerdings die FSAP und Heparin gemeinsam in der Lösung vorhanden waren, wurde die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB an humane VSMC völlig unterbunden (Abb. 3.19). Wenn die FSAP und  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB eine Stunde vorinkubiert wurden, konnte schon die FSAP alleine die Bindung von  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB an die Zelloberfläche um die Hälfte reduzieren. Die Anwesenheit von Heparin führte wiederum zu einem

vollständigen Bindungsverlust von  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB an die Zelloberfläche. SDS-PAGE mit anschließendem Western Blotting und Autoradiographie der Proben bestätigten diese Ergebnisse. Ebenso konnte dieses Ergebnis mit nativem PDGF-BB in einem Western Blotting Experiment reproduziert werden (nicht gezeigt).



**Abb. 3.19: Die FSAP bindet an PDGF-BB und inhibiert die Bindung von PDGF-BB an die Zelloberfläche.** (A) Die FSAP (10 µg/ml) wurde auf einer PVDF-Membran immobilisiert und anschließend mit 100 ng/ml PDGF-BB in der An- und Abwesenheit von 10 µg/ml Heparin, 50 µg/ml mAb570 oder mAb677 inkubiert und gebundenes PDGF-BB mit einem anti-PDGF-BB Antikörper detektiert. (B) Die FSAP (10 µg/ml) wurde auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und anschließend mit unterschiedlichen Konzentrationen PDGF-BB in der Anwesenheit (●) und Abwesenheit (□) von 10 µg/ml Heparin inkubiert. Gebundenes PDGF-BB wurde mit einem anti-PDGF-BB Antikörper detektiert. (C)  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB wurde auf konfluenten humanen VSMC in der An- und Abwesenheit von 12 µg/ml der Zweiketten-FSAP oder 10 µg/ml Heparin oder beiden Substanzen inkubiert und nach 1 h bei 4°C in SDS-Puffer lysiert. Gebundenes  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB wurde in einem  $\gamma$ -Counter quantifiziert und anschließend einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blotting und Autoradiographie unterzogen. (D) Wie (C), alle Substanzen wurden für 1 h bei 37°C vorinkubiert.





Als Konsequenz aus diesem Bindungsverlust von PDGF-BB an die Zelloberfläche muß auch der Verlust des PDGF-BB Signals an die Zelle angenommen werden. PDGF-BB-Inkubation auf humanen VSMC führte zu einer starken Phosphorylierung der MAP-Kinase p42/p44 als auch einer Phosphorylierung von Tyrosinproteinen mit einer Größe von ca. 150 und 180 kDa. Eine Anwesenheit der FSAP und Heparin über die Dauer des Experimentes (15 min) führte nicht zu einer Verringerung dieses Signals. Nach einer Vorinkubationszeit von 1 h von PDGF-BB mit der FSAP und Heparin in der Abwesenheit von Zellen konnte weder eine Phosphorylierung der MAP-Kinase p42/44 noch von Tyrosinproteinen festgestellt werden (Abb. 3.20). Interessanterweise wurde eine leichte Phosphorylierung der MAP-Kinase p42/44 durch FSAP alleine ohne Vorinkubation festgestellt, die nach der Vorinkubation nicht mehr festgestellt werden konnte. Western Blotting-Experimente zeigten keine Spaltung oder Degradation des PDGF-BB Moleküls oder des PDGF-BB-Rezeptors auf der Zelloberfläche durch die FSAP mit und ohne Heparin (nicht gezeigt). Durch eine einstündige Reaktionszeit zwischen FSAP, PDGF-BB und Heparin ließ sich also das PDGF-BB-Signal an humane VSMC unterbinden. Dieser Befund beruht nicht auf einer Spaltung von PDGF-BB oder des PDGF-BB-Rezeptors durch die FSAP.

Diese Ergebnisse geben deutliche Hinweise darauf, dass FSAP durch seine Interaktion in einem möglicherweise trimolekularen Komplex mit PDGF-BB und Heparin in der Lage ist, die Bindung von PDGF-BB an die Zelloberfläche von humanen VSMC zu verhindern und dadurch das PDGF-BB Signal in die Zelle zu unterbinden.

### 3.4 Die FSAP und sein zellulärer Cofaktor RNA in der Gerinnung

KANNEMEIER, C., NAKAZAWA, F., TRUSHEIM, H., SHIBAMIYA, A., ENGELMANN, B. AND PREISSNER, K. T. (2003): "Extracellular RNA is a procoagulant cofactor for blood clotting." **Eingereicht.**

#### 3.4.1 Die Einketten-FSAP wird während der Gerinnung nicht aktiviert

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob FSAP während der Koagulation oder der Fibrinolyse, ausgelöst durch uPA, aktiviert wird, wurden erste Gerinnungstests durchgeführt. Nachdem in humanem Plasma die Koagulation durch Kaolin, TF und  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert wurde, konnte weder in normalem Plasma noch in Plättchen-reichen-Plasma eine Spaltung von Einketten-FSAP zu Zweiketten-FSAP beobachtet werden (Abb. 3.21). Auch während der Fibrinolyse in Gegenwart von uPA wurde die Einketten-FSAP nicht aktiviert.

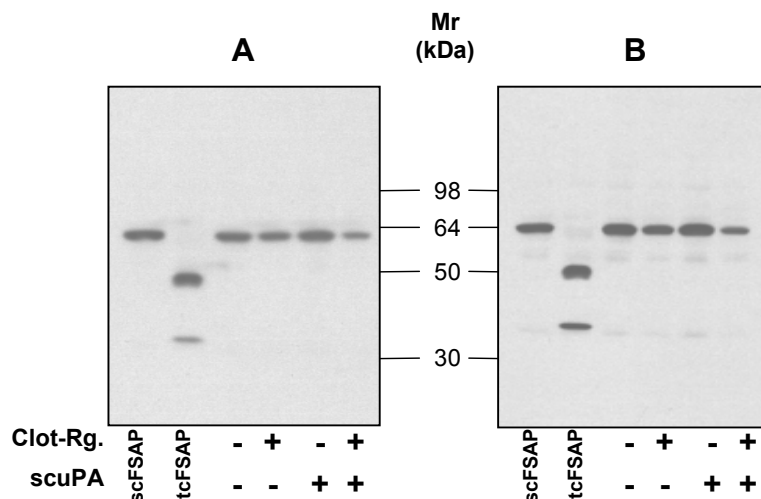


Abb. 3.21: Die FSAP wird während der Koagulation nicht aktiviert. Plasma (A) und Plättchen-reiches Plasma (B) wurden entweder ohne weitere Reagenzien inkubiert, mit einer Mischung aus TF und Kaolin zum Gerinnen gebracht (Clot-Rg.), mit 20 µg/ml scuPA inkubiert oder mit scuPA inkubiert und gleichzeitig zum Gerinnen gebracht. Die Ein- (scFSAP) und Zweiketten-FSAP (tcFSAP) wurden als Kontrolle in FSAP-Mangelplasma verdünnt und mit der gleichen Methode isoliert. Das Molekulargewicht ist angezeigt.

#### 3.4.2 RNA beschleunigt die Koagulation von rekalkifiziertem Plasma

Standard-Koagulationstests sollten zeigen, ob RNA über die FSAP eine Verkürzung der Koagulationszeit erreichen kann. In allen Experimenten verkürzte die Zugabe von RNA die Rekalkifizierungszeit von Plasma und Vollblut um ca. 20 % (Abb. 3.22). Durch eine Vorinkubation der eingesetzten RNA mit RNaseA wurde die Rekalkifizierungszeit wieder normalisiert. Desweiteren wurde RNA aus unterschiedlichen Quellen in den turbidometrischen Test eingesetzt und es zeigte sich, dass alle getesteten RNAs eine verkürzende Wirkung auf die Rekalkifizierungszeit besaßen, die eine Vorinkubation mit RNaseA aufhob. DNA veränderte die Rekalkifizierungszeit nicht, genausowenig wie RNaseA alleine. Deutlich zu beobachten war, dass *E. coli*-RNA eine gerinnungsverkürzende Aktivität besaß, die nicht durch RNaseA zu inhibieren war.

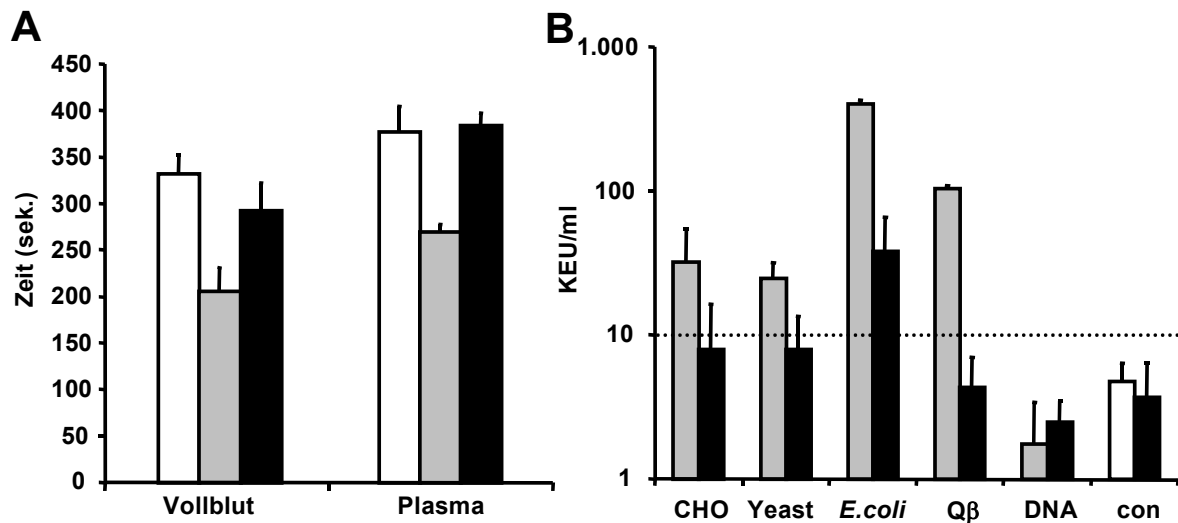


Abb. 3.22: **RNA verkürzt die Rekalzifizierungszeit.** (A) Vollblut und Plasma wurden entweder ohne jegliche Zusätze (weiße Säule), mit Hefe-RNA in einer Endkonzentration von 100 µg/ml (graue Säule) oder mit degradierter Hefe-RNA (schwarze Säule) in der gleichen Konzentration wie normale RNA für 5 min inkubiert und die Gerinnungszeit mit einem KC4 gemessen. (B) Jeweils 100 µg/ml RNA aus den angegebenen Quellen wurde entweder direkt zu Standard-Humanplasma gegeben (graue Säulen) oder mit 1 µg/ml RNaseA verdaut und anschließend zu Standard-Humanplasma gegeben (schwarze Säulen), für 5 min inkubiert und die Rekalzifizierungszeit turbidometrisch gemessen. Der Grenzwert für eine signifikante Verkürzung der Rekalzifizierungszeit ist als gepunktete Linie angegeben.

Eine Inhibierung der FSAP-Aktivität im Plasma und anschließender Zugabe von RNA sollte zeigen, ob die RNA-induzierte Verkürzung der Rekalzifizierungszeit durch die FSAP verursacht wird. Eine Vorinkubation von humanen Plasma mit einem blockierenden anti-FSAP-mAb, führte allerdings nicht zu einer Normalisierung der Rekalzifizierungszeit in der Anwesenheit von RNA (Abb. 3.23). Desweiteren verkürzte die Zugabe von RNA zu FSAP-Mangelplasma zwar nicht in dem gleichen Maße die Rekalzifizierungszeit, wie es bei normalem Plasma der Fall war, nach Rekonstitution von FSAP-Mangelplasma mit der Einketten-FSAP zeigte sich aber immer noch keine Verkürzung der Rekalzifizierungszeit

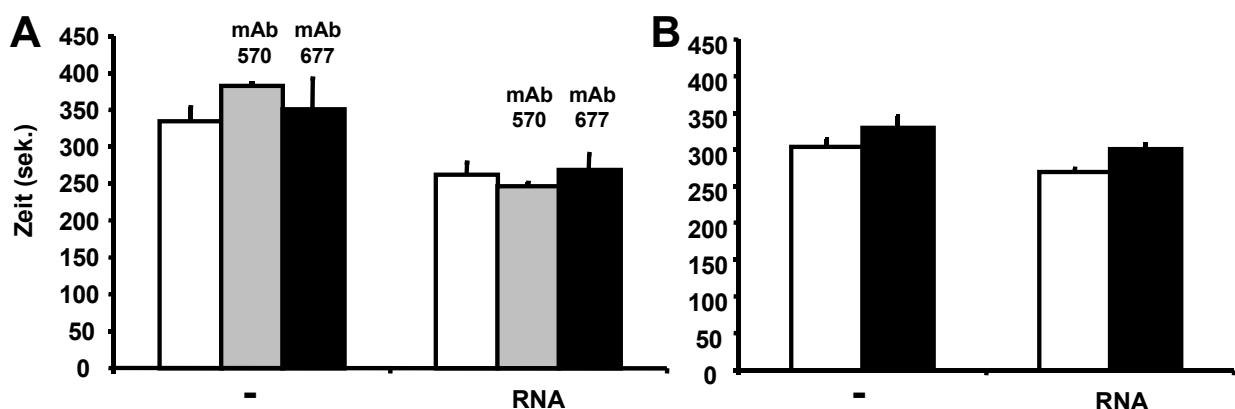


Abb. 3.23: **RNA verkürzt die Rekalzifizierungszeit nicht über die FSAP.** (A) Plasma wurde ohne Zusätze (weiße Säule), mit 100 µg/ml eines Aktivitäts-inhibierenden anti-FSAP-mAb (mAb570, graue Säule) oder mit 100 µg/ml eines Aktivitäts-neutralen anti-FSAP-mAb (mAb677, schwarze Säule) inkubiert und anschließend die Rekalzifizierungszeit mit und ohne 100 µg/ml Hefe-RNA im KC4 gemessen. (B) FSAP-Mangelplasma wurde entweder ohne Zusätze (weiße Säule) oder mit 12 µg/ml der Einketten-FSAP (schwarze Säule) inkubiert und die Rekalzifizierungszeit mit und ohne 100 µg/ml Hefe-RNA im KC4 gemessen.

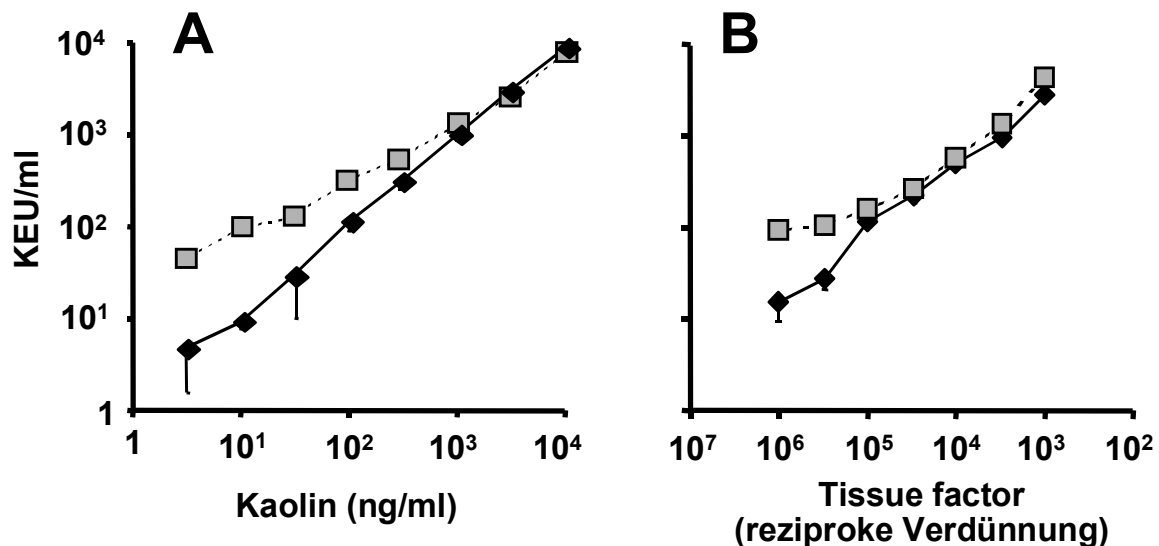


Abb. 3.24: RNA beschleunigt die Rekalzifizierungszeit induziert durch TF. (A) Kaolin wurde in Konzentrationen von 3 ng/ml bis zu 10 µg/ml mit (■) und ohne (◆) 100 µg/ml Hefe-RNA inkubiert und die turbidometrische Rekalzifizierungszeit gemessen. (B) Thromborel® wurde in Verdünnungen von 1 x 10<sup>3</sup> bis zu 1 x 10<sup>6</sup> mit (■) und ohne (◆) 100 µg/ml Hefe-RNA inkubiert und die turbidometrische Rekalzifizierungszeit gemessen.

durch die Zugabe von RNA. Diese Befunde sprechen nicht für eine Aktivierung der FSAP während der Koagulation durch RNA, sondern für einen anderen Mechanismus der RNA-vermittelten Koagulation. Weder die FSAP noch RNA aktivierten Thrombozyten zu einer Aggregation, gemessen in einem Plättchen-Aggregometer (nicht gezeigt), so dass die hier gezeigte Verkürzung der Rekalzifizierungszeit von Vollblut nicht auf die Aktivierung der primären Hämostase zurückzuführen ist.

Um einen möglichen Mechanismus auf den extrinsischen oder intrinsischen Weg der Koagulation einschränken zu können, wurden unterschiedliche Verdünnungen Kaolin oder TF mit 100 µg/ml Hefe-RNA inkubiert und die Rekalzifizierungszeit turbidometrisch bestimmt. Bei niedrigen Kaolin-Konzentrationen zeigte sich eine deutliche Beschleunigung der Rekalzifizierungszeit durch die Zugabe von RNA, während bei höheren Konzentrationen an Kaolin die Zugabe von RNA die Rekalzifizierungszeit nicht beschleunigte (Abb. 3.24). Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von RNA bei allen Konzentrationen an TF zu einer Verschnellerung der Rekalzifizierungszeit. RNA kann also die TF-induzierte Koagulation beschleunigen, während die Kaolin-vermittelte Gerinnung bei höheren Konzentrationen keinen RNA-Effekt mehr aufweist.

Während der Untersuchung unterschiedlicher Mangelplasmen zeigte sich eine insgesamt verlängerte Rekalzifizierungszeit von FXII-Mangelplasma, die durch die Zugabe von RNA um ca. 15 % verkürzt wurde. Im Gegensatz dazu gerannen FVIII- und Prekallikrein-Mangelplasma nicht durch die Zugabe von RNA (Abb. 3.25). Diese Befunde deuten auf eine Rolle von RNA im intrinsischen Gerinnungssystem im Zusammenhang mit



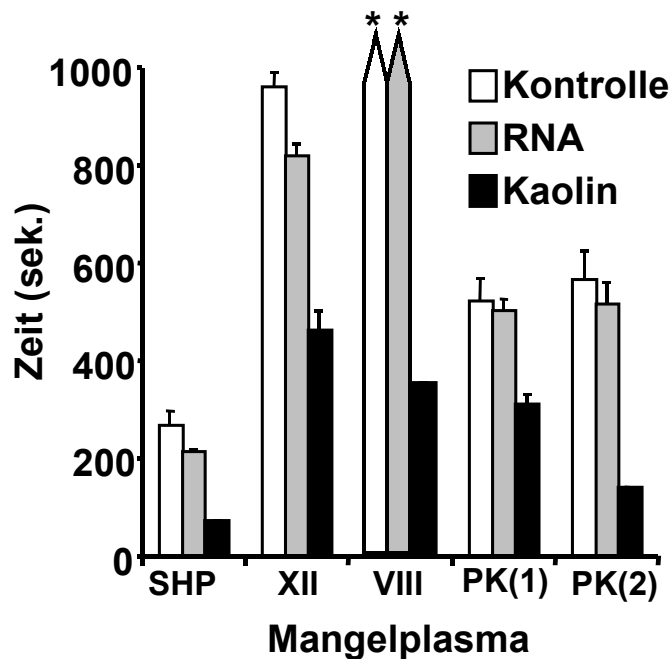
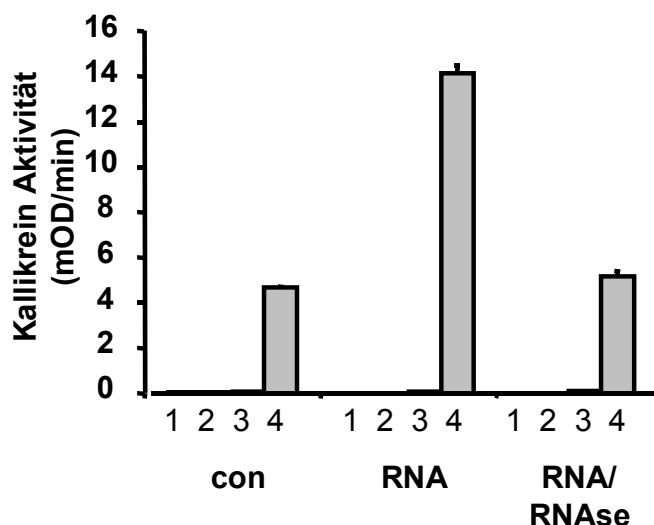


Abb. 3.25: Die Rekalkifizierungszeit von Prekallikrein- und FVIII-Mangelplasma wird durch RNA nicht verkürzt. Standard-Humanplasma und FXII-, FVIII-, Prekallikrein- (PK1) und congenitales Prekallikrein (PK2) Mangelplasma wurde ohne Zusätze (weiße Säule), mit 100 µg/ml Hefe-RNA (graue Säule) oder mit 10 µg/ml Kaolin (schwarze Säule) inkubiert und anschließend die Rekalkifizierungszeit im Amelung KC4 gemessen. Bei \*-markierten Säulen konnte keine Rekalkifizierungszeit festgestellt werden.

Proben zeigten keine Aktivität. Dieses Ergebnis deutet eine Aktivierung von Prekallikrein durch RNA und eine dadurch verursachte Beschleunigung der Rekalkifizierungszeit an.



Prekallikrein hin, da die Kontaktphase nur über den Komplex von FVIIIa/FIXa in der Lage ist, FXa zu produzieren.

Zum Beweis der Aktivierung von Prekallikrein durch RNA, wurden in einem *in vitro* Test Prekallikrein und Kininogen alleine, in An- und Abwesenheit von RNA und in Anwesenheit von vorverdauter RNA mit RNase in Bezug auf ihre Kallikrein-Aktivität getestet. Es zeigte sich, dass in der Abwesenheit von RNA die Kallikrein-Aktivität ca. 3mal höher war als bei Zugabe von vorverdauter RNA oder der alleinigen Abwesenheit von Prekallikrein und Kininogen (Abb. 3.26). Alle anderen

Abb. 3.26: RNA beschleunigt die Prekallikrein-Aktivierung. Die Kallikrein-Aktivität wurde gegen das Prekallikrein-Substrat S-2302 (0,3 mM) ohne weitere Zusätze (1), mit 10 nM Prekallikrein alleine (2), mit 10 nM Kininogen (3) und mit Prekallikrein und Kininogen (4) in der Gegenwart von 1 µg/ml Hefe-RNA (RNA) oder der gleichen Verdünnung vorverdauter RNA (RNA/RNase) oder ohne weiteren Zusätze (con) bestimmt.

## 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Darstellung und Isolierung der Einketten-FSAP im humanem Plasma und die weitere Verwendung der isolierten FSAP für Aktivierungs- und Zellversuche. Die Einketten-FSAP besitzt einen autoaktivierenden Mechanismus, der durch extra- und intrazelluläre Substanzen wie Heparin und RNA erheblich beschleunigt wird, während  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die FSAP-Aktivität unterstützen und stabilisieren. Die dargestellten Proliferation- und Migrationsversuche beweisen, dass die FSAP die mitogene Wirkung von PDGF-BB inhibiert, indem die FSAP in heparinabhängiger Weise die Bindung von PDGF-BB an die Zelloberfläche verhindert und dadurch die PDGF-BB-stimulierte Proliferation inhibiert. Gerinnungsexperimente zeigten eine deutliche Verkürzung der Rekalzifizierungszeit durch die Zugabe von RNA, die in diesem Falle aber nicht die FSAP im Plasma aktivierte, sondern Prekallikrein. Diese Ergebnisse werden nun im Einzelnen diskutiert.

### 4.1 FSAP Isolierung und Autoaktivierung

Die FSAP konnte bisher nicht als inaktives Proenzym aus humanem Plasma mit Heparin- oder Hyaluronsäure-Affinitätschromatographien isoliert werden (CHOI-MIURA et al., 1996; HUNFELD et al., 1999; ROMISCH et al., 1999). Die Anwendung einer Antikörper-Affinitätschromatographie in der Anwesenheit eines Inhibitors gegen die FSAP mit folgender Anionen-Austauschchromatographie bei einem pH-Wert von 4,5 verhinderte eine Aktivierung des Proenzyms. Bei einem pH-Wert der FSAP unterhalb des isoelektrischen Punktes von 4,9 – 5,5 ist die FSAP positiv geladen, bei einem höheren pH-Wert liegt es in einer negativ geladenen Form vor. Trotzdem bindet die FSAP an eine positiv geladene Matrix, da der pH-Wert von 4,5, bei dem die Bindung ausgeführt wird, nahe am isoelektrischen Punkt der FSAP liegt, so dass die Möglichkeit besteht, dass die FSAP noch negativ geladene Proteindomänen besitzt. Ebenso kann es sein, dass die FSAP trotz einer positiven Nettoladung der gesamten Proteinoberfläche noch Proteindomänen besitzt, die negativ geladen sind. Und da die quartären Amino-Gruppen des Anionen-Austauschers immer positiv geladen sind, unabhängig vom pH-Wert der Umgebung, ist es möglich, dass die FSAP an die MonoQ-Matrix bindet. Desweiteren gibt es bei diesem niedrigem pH-Wert kaum Proteine im Eluat der mAb-Sphärose, die eine starke negative Ladung haben, so dass sie bei einer Salzkonzentration von 0,3 M NaCl noch an eine positive Matrix binden. Dadurch wird ein besonders hohes Mass an Aufreinigung erreicht, was sich auch in der Reinheit des Endproduktes zeigt.

Durch den niedrigen pH-Wert während der Aufreinigung wird die Autoaktivierung der FSAP verhindert. Ab einem pH-Wert von ca. 5,0 ist die enzymatische Aktivität der FSAP

praktisch nicht vorhanden. Im Lagerpuffer der FSAP sind die stark hydrophilen Aminosäuren Arginin und Lysin in großer Menge vorhanden. Es besteht kaum Zweifel daran, daß die FSAP mit diesen basischen Substanzen aufgrund ihrer positiven Ladung sowohl im sauren Milieu als auch im neutralen Milieu interagiert. Die Aminosäuren wirken lösungsvermittelnd und stabilisierend auf die FSAP. Diese stabilisierende Wirkung von Arginin und Lysin wird deutlich bei der Aktivierung der Einketten-FSAP zu Zweiketten-FSAP. In Gegenwart der hydrophilen Aminosäuren Arginin und Lysin kommt es zu keiner Degradation der entstehenden Zweiketten-FSAP bei einem pH-Wert von 6,0 und es entsteht eine reine Zweiketten-FSAP Präparation. Im Gegensatz dazu wird die Zweiketten-FSAP-Präparation ohne diese Aminosäuren in ihrer Ausbeute verringert und es treten Spaltprodukte der Zweiketten-FSAP auf (nicht gezeigt). Durch die Ausbeuteberechnung der Isolierung der FSAP konnte die Einketten-FSAP Konzentration im Plasma auf 12 µg/ml bestimmt werden, was im Bereich der Konzentration anderer Gerinnungsfaktoren liegt (SCHAFER, 1994).

Extrazelluläre Substanzen wie Heparin und Hyaluronsäure, aber auch intrazelluläre Substanzen wie RNA haben einen deutlich aktivierenden Einfluß auf die FSAP. Offensichtlich bindet die negative Ladung dieser Moleküle an die FSAP und beeinflusst dadurch die FSAP-Aktivität, so dass eine schnellere Autoaktivierung der Einketten-FSAP zur aktiven Zweiketten-FSAP erfolgt, als ohne diese Moleküle. Im Zeitverlauf wird die leichte Kette der FSAP abgebaut. Damit einher geht auch ein Verlust an FSAP-Aktivität, da die leichte Kette der FSAP die Serinproteasen-Domäne enthält. Es kann daher angenommen werden, dass die Aktivität der Zweiketten-FSAP gegen sich selbst gegen eine Domäne auf der leichten Kette der FSAP gerichtet ist. Weitere Experimente werden Aufschluß darüber geben, ob es sich hierbei um eine einzelne Spaltstelle auf dem FSAP-Molekül handelt, die die FSAP selbst hydrolisiert, oder ob vielleicht mehrere Peptidbindungen durch die FSAP angegriffen werden. Durch einen Vergleich der Struktur bisher bekannter FSAP-Spaltstellen wäre es möglich die Spezifität der FSAP besser einzuschätzen. Ob der Prozeß der FSAP-Autoaktivierung eine physiologische Rolle spielt bleibt offen, auch wenn die Interaktion mit intra- und extrazellulären Substanzen und der Beitrag von  $\text{Ca}^{2+}$  es wahrscheinlich erscheinen läßt, dass diese Prozesse auch im Körper stattfinden. Tatsächlich ist es so, dass eine Bindung von aktiven Enzymen an Zelloberflächen oder extrazelluläre Matrix diese Enzymen vor der Inhibition durch z.B. Serpine schützen können und so eine Möglichkeit der biologischen Regulation darstellen (WEITZ et al., 1990).

Bekannt ist eine Autoaktivierung des eigenen Proenzyms vor allem bei Enzymen, die ein sehr unterschiedliches Spektrum an möglichen Peptidsubstraten haben, wie z. B. Trypsin

(KAY et al., 1971; BRODRICK et al., 1978). Durch den Prozeß der Autoaktivierung wird eine Amplifizierung der Aktivität des jeweiligen Enzyms erreicht, der bei bestimmten Prozessen, wie z.B. in der Gerinnungskaskade biologisch sinnvoll ist. Es ist bekannt, dass FXII sich durch eine Interaktion mit stark negativ geladenen Oberflächen selbst aktiviert kann und dass dieser Vorgang die Kontaktphase der Gerinnung auslöst (WIGGINS et al., 1979; TANS et al., 1983; TANKERSLEY et al., 1984; SHORE et al., 1987; TANS et al., 1987). Auch andere Enzyme der Kontaktphase wurden als autoaktivierend beschrieben, so wie F XI, der in der Gegenwart von negativ geladenen Oberflächen sein inaktives Proenzym zum Substrat hat (NAITO et al., 1991), oder auch Prekallikrein, wobei hier allerdings die autologe Prozessierung des Kallikreins durch sich selber zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (TANS et al., 1987). Auch ein Auto-Aktivierungsmechanismus von FVII zu FVIIa, abhängig von TF, ist bekannt (PEDERSEN et al., 1989; NAKAGAKI et al., 1991), allerdings ist es aktiver FXa, der *in vivo* inaktiven, TF gebundenen FVII am deutlichsten zu FVIIa spaltet und dadurch einen signifikanten Beitrag zur Entstehung der Blutgerinnungskaskade beiträgt (MASYS et al., 1982; RAO et al., 1988). Falls es sich also bewahrheiten sollte, dass unter bestimmten Umständen eine FSAP-Autoaktivierung im Plasma zustande kommt, würde diese Amplifizierung einen signifikanten Beitrag zur Entstehung der Gerinnungskaskade beitragen.

Interessanterweise kommt es bei der Zugabe von  $\text{Zn}^{2+}$ , nicht zu einer verstärkten FSAP-Aktivität, wie bei  $\text{Ca}^{2+}$  beobachtet, sondern zu einer Inhibition der FSAP-Aktivität (ROMISCH et al., 1999). Die Anwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$  wird als essentiell für die Assemblierung des Kontaktphasen-Komplexes der Gerinnung bestehend aus HMW-Kininogen, Prekallikrein und FXII betrachtet (SHORE et al., 1987; SHIBAYAMA et al., 1994). Da die FSAP ebenfalls als HMW-Kininogen spaltendes Enzym beschrieben wurde (ETSCHEID et al., 2002), stellt sich die Frage, ob diese FSAP-Aktivität auch durch  $\text{Zn}^{2+}$  blockiert wird. Diese Frage wird in der zitierten Publikation nicht beantwortet. Erste Vorversuche deuten an, dass die FSAP eine Spaltung von HMW-Kininogen in der Anwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$  immer noch durchführen kann (eigene Beobachtung). Das deutet auf eine Modulation der FSAP-Aktivität durch Kationen hin.

Eine Inkubation der Einketten-FSAP-Präparation mit einem blockierenden anti-FSAP-mAb führt zu einer Inhibition der FSAP-Autoaktivierung, ebenso wie die Inkubation mit anderen FSAP-inhibierenden Substanzen wie  $\text{Zn}^{2+}$  oder Serinproteaseinhibitoren. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte der FSAP-Aktivierung nicht durch mögliche Verunreinigungen der Einketten-FSAP-Präparation mit anderen Enzymen verursacht wurden. Die eigenen Beobachtungen bezüglich der FSAP-Autoaktivierung decken sich mit den Ergebnissen anderer Gruppen (ETSCHEID et al., 2000; CHOI-MIURA et al., 2001).

Die aktiven Enzyme der Gerinnungskaskade aktivierten die FSAP nicht. Allerdings konnten die enzymatisch aktiven Substanzen scuPA, HMW-uPA und uPA die FSAP in seiner initialen Phase der Autoaktivierung beschleunigen. Eine Reduzierung der Konzentration der uPA-Isoformen von einem 10fach molaren Überschuß auf einen 5fache molaren Überschuß gegenüber der FSAP, führte zu einer Aufhebung der initialen Beschleunigung der Autoaktivierung der FSAP. Unter normalen Umständen liegt die Substratkonzentration immer über der Enzymkonzentration (STRYER, 1994), und so stellt sich die Frage nach der physiologischen Relevanz dieses Befundes. Es kommt zwar durchaus zu einer Anreicherung von Substanzen wie scuPA oder uPA an der Zellmembran durch die Interaktion mit dem Urokinase-Rezeptor (BARNATHAN et al., 1990) und man könnte auch spekulieren, dass es dadurch zu einem extremen Konzentrationsüberschuß an uPA gegenüber der FSAP an der Zellmembran kommt, und dadurch zu einer FSAP-Aktivierung. Ein Beispiel für einen zukünftigen Versuch wäre eine Inhibition der FSAP-Aktivität, um die FSAP-Autoaktivierung auszuschließen, und anschließende Inkubation der inhibierten FSAP mit den uPA-Isoformen und darauffolgender Detektion des Zustandes der FSAP durch Western Blotting. Das würde einen Aufschluß darüber geben, ob es sich hier um einen FSAP-Autoaktivierungseffekt handelt, oder tatsächlich um die enzymatische Aktivität der uPA-Isoformen gegenüber der FSAP.

#### *4.2 RNA unterstützt die FSAP-Autoaktivierung*

Auf unterschiedlichen Zelloberflächen kommt es zu einer sehr schnellen Aktivierung der FSAP. Alle getesteten Zelltypen und deren konditioniertes Medium zeigten einen deutlich aktivierenden Einfluß auf die Einketten-FSAP-Aktivität. Deutlich geringer war dieser aktivierende Einfluß bei Osteosarkomzellen und glatten Muskelzellen. Nur eine RNase-Behandlung des konditionierten Mediums resultierte in einem Verlust der FSAP-Cofaktor-Aktivität, während andere Behandlungen, inklusive tryptischem Verdau und Hitzdenaturierung des konditionierten Medium nicht zu einer Reduktion der FSAP-Cofaktor-Aktivität führten. Das zeigt, dass es sich hierbei nicht um eine Aktivierung der Einketten-FSAP durch andere Proteasen handelt, sondern wiederum um eine verstärkte Autoaktivierung der FSAP. Entgegen den Annahmen, dass diese Einketten-FSAP Aktivierung durch Glycosaminoglycane auf der Zelle zustande kommen kann, wurde bei einer mutierten Zelllinie, die keine Glycosaminoglycane exprimieren kann, das gleiche Mass an Einketten-FSAP-Autoaktivierung festgestellt, wie bei der entsprechenden Wildtyp-Zelle. Das spricht für eine verstärkte Einketten-FSAP Autoaktivierung durch die Anwesenheit von RNA auf der

Zelloberfläche oder im Zellmedium. Ein weiteres Indiz für diese Theorie der verstärkten FSAP-Autoaktivierung durch RNA ist die verminderte Autoaktivierung in Gegenwart der sehr stabilen Fibroblasten-ähnlichen Osteosarkomzellen und glatten Muskelzellen. Diese Zelltypen haben eine sehr stabile Zellwand und produzieren große Mengen extrazellulärer Matrix, inklusive Glycosaminoglycanen, die ihnen zusätzliche Stabilität verleiht (BILLIAU et al., 1977). Durch diese Stabilität werden möglicherweise weniger Zellen während der Zellkultur oder der Produktion des konditionierten Medium zerstört und es könnte sein, dass dadurch weniger freie RNA im konditionierten Medium dieser Zelltypen vorhanden ist, was zu einer geringeren Einketten-FSAP-Autoaktivierung führt. Wenn Glycosaminoglycane die Ursache der gesteigerten FSAP-Aktivität wären, müsste gerade diese Zelltypen ein besonders hohes Mass an FSAP-Aktivität zeigen.

Fraktionen, die durch eine Anionen-Austauschchromatographie mit RNA angereichert wurden, und auch RNA, die mittels gängiger kommerzieller Methoden aus unterschiedlichen Quellen isoliert wurde, zeigten eine deutlich aktivierende Wirkung auf die Einketten-FSAP, die nach einer Vorbehandlung der RNA mit RNase aufgehoben wurde. Ebenso wurde bewiesen, dass immobilisierte FSAP und RNA auch in hochkonzentrierten Proteingemischen wie 1 % BSA oder dem konditionierten Medium miteinander interagieren. Es ist durchaus möglich, dass die FSAP eine typische RNA-Bindungsstelle besitzt, da es eine große Diversität unter den in jüngster Zeit festgestellten RNA-Bindungsdomänen gibt (WILLIAMSON, 2000), so dass mögliche Ähnlichkeiten zwischen der FSAP und einer dieser Domänen festgestellt werden können. Ein Alignment bekannter RNA-Bindungsdomänen, wie die „conserved double-stranded RNA binding domain“ (ST JOHNSTON et al., 1992), die ZINC-Finger-Domäne (RHODES et al., 1993) oder der KH-Domäne (MAHONE et al., 1995) mit der FSAP zeigte jedoch keine signifikanten Übereinstimmungen.

Da sich die Autoaktivierung der FSAP nach RNase Verdau der eingesetzten RNA wieder normalisierte, kann davon ausgegangen werden, dass die FSAP eine komplexe, hochmolekulare Struktur benötigt, um die Autoaktivierung zu beschleunigen. Wenn es nur die reine negative Ladung der RNA wäre, die zu einer Einketten-FSAP-Autoaktivierung führt, dann müssten die freien Ribonukleotide der mit RNase verdauten RNA ebenfalls zu einer FSAP-Autoaktivierung führen. Das ist jedoch nicht der Fall. Dieser Befund geht einher mit dem Befund, dass niedermolekulare Heparine, die im Grunde die gleiche negative Nettoladung wie hochmolekulare Heparine besitzen, einen geringeren Effekt auf die FSAP-Autoaktivierung besitzen als hochmolekulare Heparine (VERMÖHLEN, 1999, pers. Mitteilung). So kann man sich vorstellen, dass es die hochmolekularen, negativ geladenen Substanzen sind,

die aufgrund ihrer Größe möglicherweise an mehreren Stellen des FSAP-Moleküls binden und dadurch die FSAP in eine Konformation bringen, die für eine Autoaktivierung geeignet ist.

#### *4.3 Die FSAP inhibiert die PDGF-BB-vermittelte Proliferation von glatten Muskelzellen*

Die Proliferations- und Migrationsexperimente mit glatten Muskelzellen in der Anwesenheit der FSAP zeigten folgendes Bild. Während die FSAP die Proliferation der PDGF-BB-stimulierten glatten Muskelzellen auch ohne Heparin inhibierte, war Heparin für eine Inhibition der PDGF-BB-vermittelten Migration durch die FSAP unerlässlich. Doch obwohl eine Inkubation mit FSAP-Inhibitoren während der Proliferations- und Migrationsexperimente eindeutig die Notwendigkeit der Serinproteasen-Aktivität der FSAP für die inhibitorische Wirkung der FSAP aufzeigte, wirkte eine Vorinkubation von FSAP, PDGF-BB und Heparin mit anschließender Inhibition der FSAP-Aktivität ebenfalls antiproliferativ. Entgegen anderen Befunden, die eine Spaltung des bFGF-Moleküls durch die FSAP beschreiben (ETSCHIED et al., 2003), zeigte die FSAP keine Spaltung des PDGF-BB-Moleküls oder des PDGF-BB-Rezeptors der glatten Muskelzellen in SDS-PAGE und Western Blotting-Versuchen. Es bleiben also nur Heparin und die FSAP selbst als Ziel der inhibierenden FSAP-Aktivität. Eine Modifikation des Heparin-Moleküls durch die FSAP ist deswegen unwahrscheinlich, weil in ersten Vorversuchen eine Vorinkubation der FSAP und Heparin mit anschließender Inkubation auf PDGF-BB-stimulierten Zellen keine Inhibition der Proliferation zu sehen war (eigene Beobachtung). Das zeigt, dass die FSAP keine Modifikationen an Heparin selber vornimmt. So bleibt nur die FSAP selber als Ziel der inhibitorischen FSAP-Aktivität. Diese Theorie wird durch weitere Indizien unterstützt.

Die Gegenwart von Heparin führte zu einer sehr schnellen Autodegradation der FSAP. Trotzdem wirkte die Anwesenheit von Heparin stimulierend auf die Proliferations-inhibitorische FSAP-Aktivität. Die FSAP-Aktivität ist also für eine kürzere Zeit auf den Zellen vorhanden wenn Heparin vorhanden ist. Daraus könnte die Schlußfolgerung gezogen werden, dass die Autodegradation der FSAP zu FSAP-Fragmenten führt, die eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von glatten Muskelzellen haben. Das wird auch deutlich, wenn der Unterschied zwischen Proliferations- und Migrationsexperimenten betrachtet wird. Die Migrationsexperimente dauern 5 h, während die Proliferationsexperimente mindestens 24 h andauern. Man darf also spekulieren, dass es innerhalb der 5 h für die Migrationsexperimente in der Abwesenheit von Heparin nicht zu einer so umfangreichen Autodegradation der FSAP

kommt, wie es während der 24 h für die Proliferationsexperimente der Fall ist. Aus diesem Grunde könnte die FSAP im Migrationsexperiment nur in der Anwesenheit von Heparin antimigratorisch wirken, weil die Autodegradation, und damit die Freisetzung des inhibierenden FSAP-Fragments, wesentlich schneller vor sich geht.

Die Bindungs- und Signaltransduktionsversuche von PDGF-BB und der FSAP deuten ebenfalls die Hypothese der FSAP-Fragmentierung in der Gegenwart von Heparin als Mechanismus der anti-mitogenen Eigenschaften der FSAP an. Eine Bindung zwischen der FSAP und PDGF-BB wurde möglicherweise durch Heparin gesteigert, weil es zu einer Autodegradation kam und ein FSAP-Fragment an PDGF-BB binden konnte. Aus diesem Grunde könnte auch die Zugabe von inhibitorischen mAbs nicht zu einer Reduktion der Bindung zwischen der FSAP und PDGF-BB geführt haben, weil der inhibitorische mAb nicht vor der Inkubation der FSAP mit Heparin hinzugegeben wurde, sondern ausschließlich während der Bindung. Das FSAP-Fragment wäre dann schon entstanden und könnte trotz blockierendem mAb an PDGF-BB binden. Ein Bindungsversuch in der Anwesenheit des inhibierenden mAb wird Klarheit über diese Hypothese geben.

Möglicherweise reduzierte eine Vorinkubation zwischen PDGF-BB und der FSAP nur zum Teil die Bindung von PDGF-BB an die Zelloberfläche, weil die Autodegradation der FSAP in der Abwesenheit von Heparin langsam abläuft und nur eine geringe Konzentration des inhibierenden FSAP-Fragments entstanden sein könnte. Im Gegenteil dazu reduzierte die FSAP die PDGF-BB Bindung an die Zelloberfläche vollständig, sobald Heparin anwesend war. Das gleiche Bild zeigte sich in den Signaltransduktionsversuchen. Nach einer Reaktionszeit von 1 h, der gleichen Zeit, die für die Bindungsversuche von PDGF-BB an die Zelloberfläche aufgewendet wurde, inhibierte die FSAP das PDGF-BB-induzierte Signal in glatten Muskelzellen in der Anwesenheit von Heparin vollständig. Eine Reaktionszeit von 15 min reichte für diese inhibitorische Wirkung der FSAP nicht aus. Die Assemblierung des Komplexes, der die PDGF-BB-stimulierte Proliferation inhibieren kann, dauert also länger als 15 min. Tatsächlich wurde eine leichte Stimulierung der MAP-Kinase p42/p44 nach FSAP-Inkubation beobachtet. Ob dieser Effekt vielleicht die leichte Stimulierung der Migration von glatten Muskelzellen durch die Zugabe von FSAP erklären kann, werden zukünftige Experimente klären müssen. Während der Detektion des Gesamtanteils an phosphoryliertem Protein zeigten sich nach PDGF-BB-Gabe zwei deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 150 und 180 kDa. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich hier um die phosphorylierte Form des PDGF-BB-Rezeptors und des EGF-Rezeptors, da bekannt ist, dass nach einer Dimerisierung des PDGF-BB-Rezeptors mit anschließender Phosphorylierung es



auch zu einer Trans-Aktivierung des EGF-Rezeptors kommt (COUNTAWAY et al., 1989; SAITO et al., 2001).

Die Hypothese des Mechanismus der FSAP-vermittelten Inhibition PDGF-BB-stimulierter Proliferation und Migration stellt sich wie in Abb. 4.1 dar. Durch eine veränderte Autodegradation der FSAP in der Anwesenheit von Heparin kommt es zu einer FSAP-Fragmentierung. Ein FSAP-Fragment könnte an PDGF-BB binden und so die Bindung von PDGF-BB an seinen zellulären Rezeptor inhibieren. Ob es sich hierbei um einen trimolekularen Komplex bestehend aus PDGF-BB, Heparin und der FSAP handelt, oder ob nur PDGF-BB und die FSAP binden, werden zukünftige Bindungsversuche zeigen müssen.

Andere Zelltypen, die ebenfalls auf PDGF-BB reagieren, wie die Osteosarkomzelllinie MG-63, wurden ebenfalls in heparinabhängiger Weise in ihrer Proliferation durch

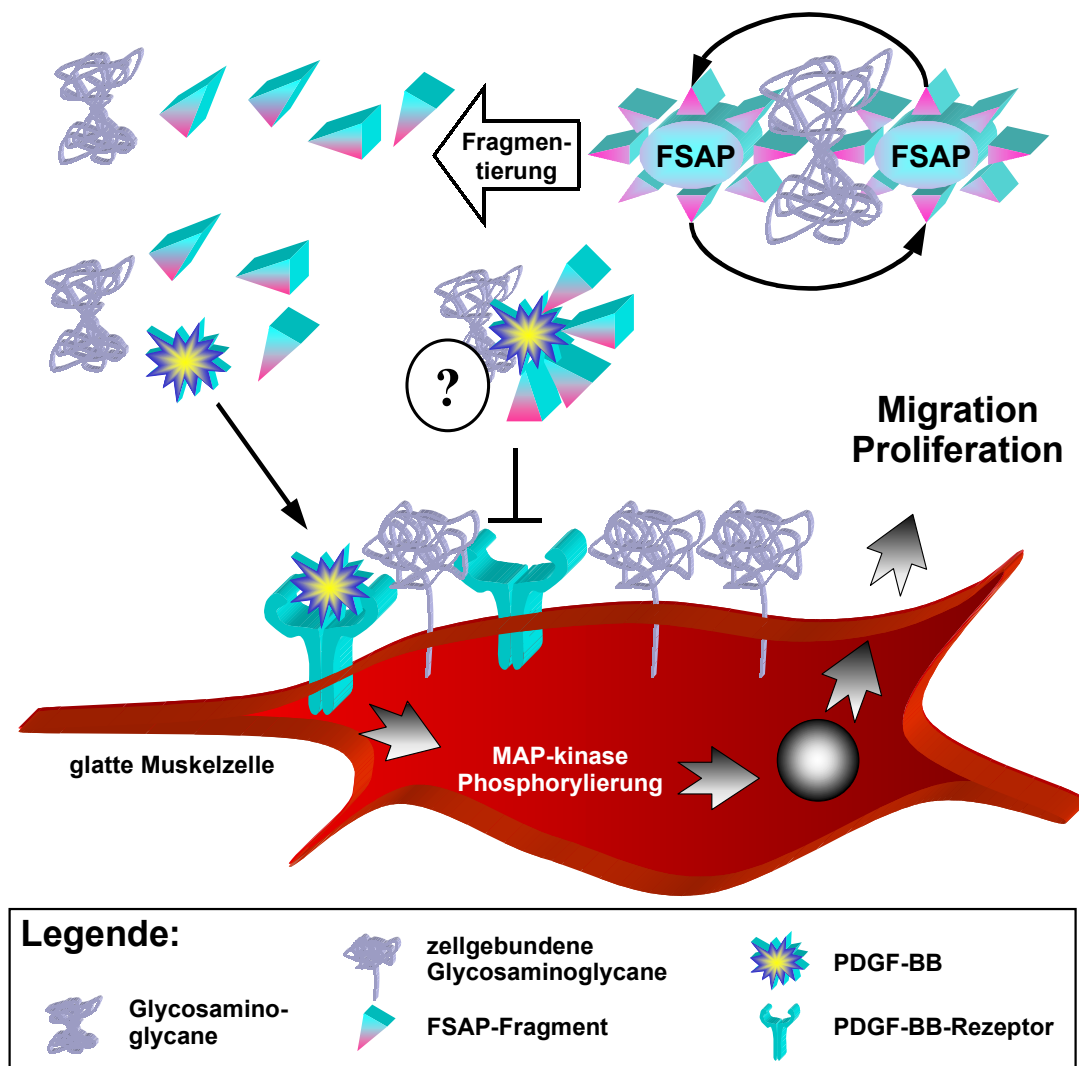


Abb. 4.1: Hypothese des Mechanismus der Inhibition der PDGF-BB-vermittelten Proliferation von glatten Muskelzellen durch die FSAP. Durch die autokatalytische FSAP-Degradation in der Anwesenheit von Glycosaminoglycanen kommt es zur Freisetzung von FSAP-Fragmenten, die mit PDGF-BB und Glycosaminoglycanen einen Komplex eingehen, der die Bindung und damit das Signal von PDGF-BB an die Zelle unterbinden.

Zweiketten-FSAP gehemmt. Allerdings konnten z.B. Endothelzellen in ihrer VEGF-vermittelten Proliferation nicht gehemmt werden. Diese Befunde sprechen eher für eine Wachstumsfaktor-spezifische Aktivität der FSAP als für eine zellspezifische Aktivität. Ein inhibierender Einfluß von Heparin auf die Proliferation von glatten Muskelzellen wird in der Literatur diskutiert (CLOWES et al., 1977; GUYTON et al., 1980; HOOVER et al., 1980; GARG et al., 2000; KAZI et al., 2002; PATEL et al., 2002), in den vorliegenden Experimenten konnte aber keine Inhibition der Proliferation durch die eingesetzten Konzentrationen Heparin festgestellt werden.

Ein aktivierender aber auch inhibierender Einfluß von Komponenten des Gerinnungssystems auf vaskuläre Zellen ist allgemein bekannt. So kann z.B. der Koagulations-Initiierungs-Komplex, bestehend aus TF, FVIIa und FX die Protease-aktivierbaren Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 aktivieren und dadurch eine zelluläre Aktivierung auslösen, noch bevor die Gerinnung ausgelöst wird (CAMERER et al., 2000; RIEWALD et al., 2001; RIEWALD et al., 2002). Am bekanntesten ist mit Sicherheit die aktivierende Wirkung von Thrombin auf die Thrombinrezeptoren PAR-1 und PAR-2 (VU et al., 1991; MARI et al., 1996). Dadurch wird auch während der Gerinnung eine Zellaktivierung hervorgerufen, die eine Beschleunigung der Gerinnung durch eine vermehrte Expression von TF und von von-Willebrandt-Faktor auf der Lumenseite der Gefäße hervorruft (MOLINO et al., 1997; ALM et al., 1999; LANGER et al., 1999). Eine inhibierende Wirkung auf Gefäßzellen wurde von dem ProteinC/EPCR-Mechanismus beschrieben. Dabei kam es in klinischen Studien durch die Administration von ProteinC und aktivem ProteinC zu einer Inhibition des Inflammationsreizes (FISHER et al., 2000). Die Inhibition der Inflammationsreaktion von Endothelzellen funktioniert durch die Aktivierung des PAR-1 durch an den EPCR gebundenes ProteinC (SHU et al., 2000; RIEWALD et al., 2002).

Die FSAP ruft eine negative Regulierung vaskulärer Zellen hervor. Das wird vor allem deutlich in einer Studie, in der die MarburgI-Mutation der FSAP, die eine um 50 – 80 % reduzierte Prourokinase-aktivierende Aktivität besitzt, als neuer, unabhängiger Risikofaktor für Atherosklerose mit einer odd ration von 6,6 beschrieben wurde (WILLEIT et al., 2003). Auch wenn der eigentliche Mechanismus der FSAP in der Atherosklerose noch nicht aufgeklärt ist, könnte man doch in Anbetracht der oben genannten Ergebnisse spekulieren, dass die Prourokinase-aktivierende Aktivität der FSAP wichtig ist, damit eine übermäßige Proliferation von glatten Muskelzellen in der Atherosklerose unterbunden wird. Das wäre ein weiteres Argument für die Notwendigkeit der FSAP-Aktivität, ob allerdings die FSAP-Fragmentierung *in vivo* ebenso funktioniert wie *in vitro* wird erst durch weitere

Untersuchungen herausgefunden werden können. Ein deutliches Indiz für eine physiologische Bedeutung der FSAP in der Atherosklerose wurde durch histologische Untersuchungen belegt, in denen die FSAP in der Umgebung der Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques identifiziert werden konnte (KANNEMEIER et al., 2003).

#### 4.4 RNA beschleunigt die Blutgerinnung

Neben den beschriebenen autoaktivierenden und Proliferations- und Migrations-inhibierenden Eigenschaften der FSAP wurde auch geprüft, ob durch eine RNA-induzierte Autoaktivierung der FSAP im Plasma, die FSAP einen Einfluß auf die Gerinnungszeit von Plasma haben könnte. Das konnte jedoch nicht bestätigt werden. Inhibitorische anti-FSAP-mAb hemmten nicht die Erniedrigung der Rekalzifizierungszeit von humanem Plasma durch die Zugabe von RNA, ebensowenig wie nach Rekonstitution von FSAP-Mangelplasma mit physiologischen Konzentrationen der Einketten-FSAP eine Verkürzung der Rekalzifizierungszeit eintrat. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass entweder RNA die FSAP im Plasma nicht aktiviert, oder dass der Beitrag durch die von RNA aktivierter FSAP für die Gerinnungszeit keine Rolle spielt.

RNA aus unterschiedlichen Quellen hat einen verkürzenden Einfluß auf die Rekalzifizierungszeit von Plasma und Vollblut. Dabei fällt vor allem auf, dass RNA, isoliert aus *E. coli*, einen Anteil RNA besitzt, der nicht durch einen RNase-Verdau in seiner verkürzenden Wirkung auf die Rekalzifizierungszeit inhibiert werden kann. Ob es sich hierbei möglicherweise um eine doppelsträngige RNA-Form handelt, die durch RNaseA nicht degradiert werden kann, oder sogar um eine andere Substanzklasse, die ebenfalls einen aktivierenden Einfluß auf die Gerinnung hat, werden zukünftige Experimente klären. Da doppelsträngige DNA keinen Einfluß auf die Rekalzifizierungszeit hatte, kann hier von einem spezifischen RNA-Effekt ausgegangen werden.

Die RNA-induzierte Verkürzung der Gerinnungszeit wird durch den intrinsischen Kontaktphasen-Komplex hervorgerufen, weil die Zugabe von RNA die TF-induzierte Gerinnung in allen getesteten Konzentrationen steigerte, während RNA die Kaolin-induzierte Gerinnung in höheren Konzentrationen nicht mehr verkürzte. Bei einer ausreichenden Aktivierung von Plasma mit Kaolin kommt es also dazu, dass die Faktoren, die auch durch RNA aktiviert werden, schon durch die hohen Konzentrationen Kaolin aktiviert worden sind und so RNA keinen Einfluß auf die Gerinnung mehr nehmen kann.

Die Messung der Rekalzifizierungszeit unterschiedlicher Gerinnungsfaktor-Mangelplasmen zeigte, dass RNA nicht die Gerinnungszeit von FVIII- und Prekallikrein-

Mangelplasma beeinflusst, wohl aber die Gerinnungszeit von FXII-Mangelplasma. Durch einen FVIII-Mangel im Plasma fällt ein wichtiger Beschleunigungsweg der Gerinnung aus (BIGGS et al., 1952; OSTERUD et al., 1977; ELODI et al., 1979; MANN et al., 1990). Das wird vor allem deutlich, wenn die Kontaktphase aktiviert wird, da die Komplexbildung zwischen FVIII und FIX der einzige Weg ist, über den die Kontaktphase ausreichend FX aktivieren kann. Erst wenn einmal FX aktiviert ist, kommt es zur Thrombinbildung. Wenn FVIII nicht vorhanden ist, kann über den Kontaktphasenweg auch kein Thrombus entstehen. Deswegen ist der Befund, dass sich FVIII-Mangelplasma nicht durch die Zugabe von RNA in seiner Gerinnungszeit verkürzt, in Übereinstimmung mit der Annahme, dass RNA sich vor allem auf Faktoren der Kontaktphase auswirkt. Durch einen FXII-Mangel hingegen wird die *in-vitro*-Gerinnungszeit verlängert, es kommt aber trotzdem es zu einer Aktivierung von FXI ohne FXII, was sich auch in der klinischen Manifestation eines FXII-Mangels zeigt, bei der es keine ernsthaften Blutungskomplikationen gibt, sondern es eher zu thromboembolischen Komplikationen kommt (RATNOFF et al., 1955; GOODNOUGH et al., 1983; LEVI et al., 1992; GAILANI et al., 1993). Ebenso kann bei einem Prekallikrein-Mangel eine verlängerte Gerinnungszeit *in vitro* angenommen werden, da der Kontaktphasen-Komplex sich nicht in seiner eigentlichen Form bilden kann (WIGGINS et al., 1977), aber trotzdem kann es durch eine Aktivierung von FXI und zu einer Aktivierung von FIX kommen. So haben auch Patienten mit einem Prekallikrein-Mangel keine thromboembolischen Komplikationen (WUEPPER, 1973; ABILDGAARD et al., 1974). Da es hier nicht zu einer Verkürzung der Rekalzifizierungszeit durch RNA-Zugabe kommt, kann Prekallikrein als mögliches Ziel der RNA angesehen werden.

In einem *in vitro*-Test wird deutlich, dass RNA die Aktivierung von Prekallikrein unterstützt. In der Literatur wird diskutiert, dass der Kontaktphasen-Komplex aus FXII, HMW-Kininogen und Prekallikrein sich nach einer Autoaktivierung von FXII an der Zellmembran zusammensetzt, dort FXII Prekallikrein zu Kallikrein aktiviert, was zu einem positiven Feedback-Loop führt, da Kallikrein auch FXII mit hoher Affinität aktiviert. Diese Theorie setzt aktiven FXII voraus, und viele Publikationen beschäftigten sich mit der Frage, welches natürliche Substrat zu einer verstärkten Autoaktivierung von FXII führen kann (WIGGINS et al., 1979; MILLER et al., 1980; SILVERBERG et al., 1980; DUNN et al., 1982; ESPANA et al., 1983; TANKERSLEY et al., 1984). Da es vor allem nicht-physiologische Substanzen wie Glas oder Kaolin waren, die eine Autoaktivierung, ähnlich der von FSAP, deutlich förderten, blieb das Rätsel der physiologischen Aktivierung von FXII als unterstützender Faktor für die Gerinnung ungelöst. FXII kann aber an einen Multiprotein-Rezeptorkomplex bestehend aus dem Urokinase-Rezeptor, gC1qR und Cytokeratin1 auf Endothelzellen in seiner inaktiven Form binden (SCHMAIER et al., 1999; MAHDI et al., 2002). In diesen Publikationen wird diskutiert, dass es

zuerst zu einer Aktivierung von Prekallikrein durch eine bisher nicht identifizierte Protease zellulären Ursprungs kommt. Das deckt sich mit Beobachtungen von RØJKJÆR et al., die eine Aktivierung von Prekallikrein auf den Endothelzellen beobachten, unabhängig von FXII (RØJKJÆR et al., 1998). Desweiteren beschreibt eine weitere Arbeit die Aktivierung von Prekallikrein durch das „heat shock protein 90“, das von Endothelzellen sezerniert wird (JOSEPH et al., 2002). Diese Beobachtungen könnten durchaus auf RNA zurückzuführen sein, da anzunehmen ist, dass RNA in allen Zellmedien ubiquitär vorhanden ist.

Wenn die Kontaktphase einen signifikanten Beitrag zur Gerinnung leistet, stellt sich die Frage, warum Patienten mit einem kongenitalen Mangel an Faktoren der Kontaktphase keine Blutungsneigung, sondern eher eine Thromboseneigung haben (s. o.). Erklärt wird das, indem der Beitrag der Kontaktphase in der Gerinnung nicht prokoagulatorisch, sondern profibrinolytisch sein soll, indem die Aktivierung von Prekallikrein auch zu einer Gegenregulation zur Gerinnung führt durch die nachgewiesene Aktivierung der Plasminogen-Aktivatoren durch Kallikrein (GUREWICH et al., 1993; LOZA et al., 1994; LENICH et al., 1995; LENICH et al., 1997). Es stellt sich dann aber immer noch die Frage nach dem biologischen Sinn, warum die Kontaktphase in der Lage ist eine signifikante Menge an Thrombin zu bilden. Möglicherweise leistet RNA keinen signifikanten Beitrag zur Blutgerinnung während einer akuten Verletzung, sondern ist als Auslöser für die Hyperkoagulabilität verantwortlich. Wenn es zu einer massiven Freisetzung von RNA im Blut kommt, verlagert sich dadurch vielleicht das Gleichgewicht der aktiven und inaktiven Gerinnungsenzyme auf die aktive Seite, so dass bei einem Reiz wesentlich schneller ein Thrombus entsteht als es normalerweise der Fall ist. Das wird durch Untersuchungen bestätigt, die einen Anstieg des Plasma-mRNA-Spiegels beschreiben in malignen Tumoren beschreiben (ANKER et al., 2001; NG et al., 2002; ANKER et al., 2003) und weiteren Untersuchungen, die über eine Hyperkoagulabilität bei Patienten mit malignen Tumoren berichten (GOUIN-THIBAUT et al., 2001).

Durch die gezeigte Aktivierung von Prekallikrein durch RNA kann nun eine neue Auslösung der Kontaktphase postuliert werden (Abb. 4.2). RNA fungiert hierbei als negativ geladene Oberfläche, aktiviert aber nicht FXII, sondern Prekallikrein. Durch die Aktivierung von Prekallikrein könnte es möglich sein, dass sich der Komplex aus FXII, HMW-Kininogen und Prekallikrein auch ohne die Aktivierung von FXII auf der Zelloberfläche zusammensetzt. Die Aktivierung von FXII würde zeitlich erst nach der Aktivierung von Prekallikrein erfolgen, wie es auch schon von MAHDI et al. beschrieben wurde. Der erste Schritt für die Aktivierung der Kontaktphase wäre demnach nicht mehr die Autoaktivierung von FXII, sondern die Aktivierung von Prekallikrein.

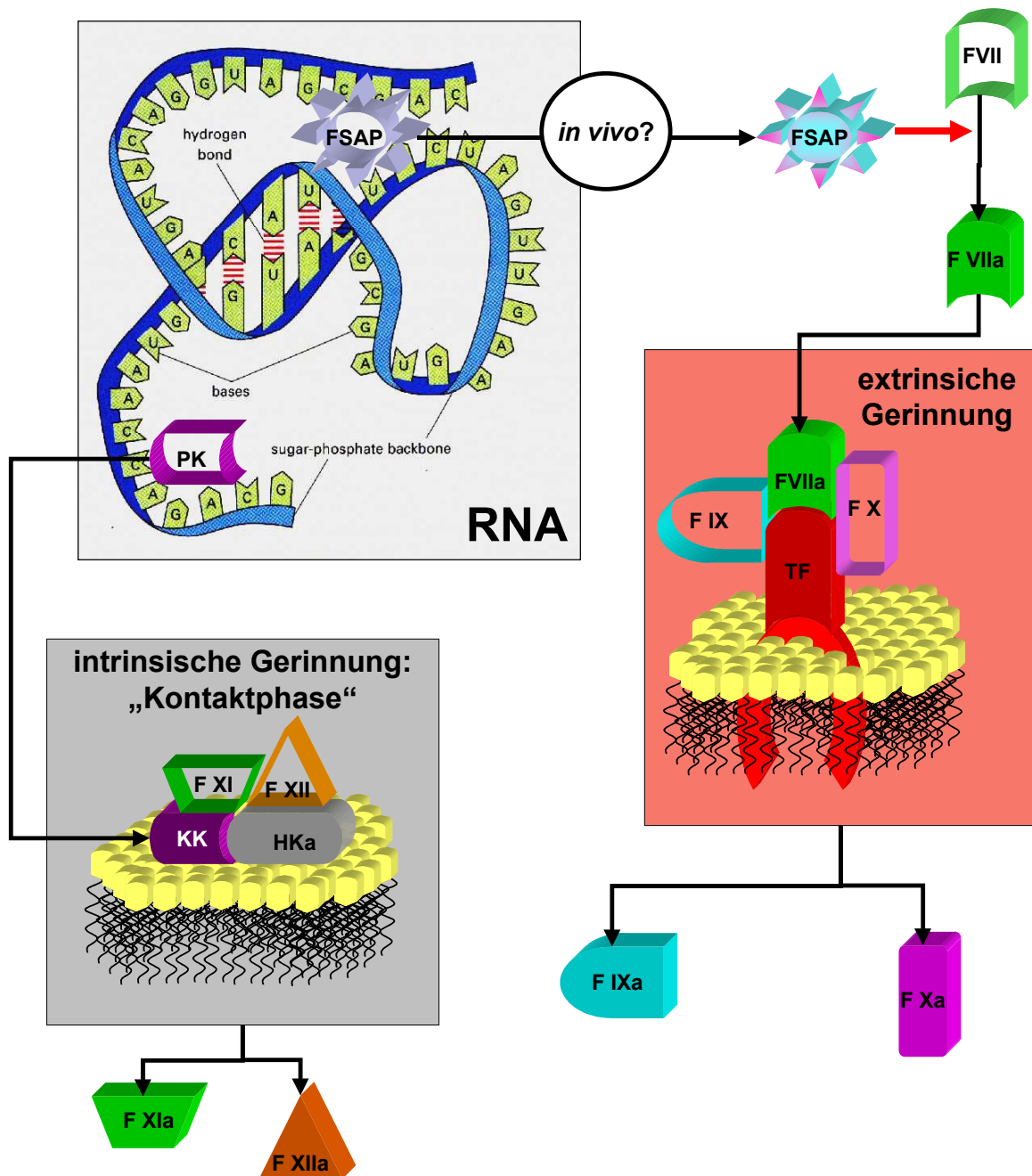


Abb. 4.2: **Hypothetisches Modell der Aktivierung der Koagulation durch RNA.** RNA interagiert mit Prekallikrein und ermöglicht dadurch die Assemblierung des Kontaktphasen-Komplexes auf der Zelloberfläche nach MAHDI et al. Aus diesem intrinsischem Komplex werden dann FXIIa und FXIa entlassen, die für weitere, vereinfachte Komplexbildungen zur Verfügung stehen. Ob die Aktivierung von FSAP durch RNA *in vivo* tatsächlich passiert, müssen zukünftige Experimente klären.

Die Möglichkeit, dass negativ geladene, intrazelluläre Komponenten möglicherweise als negativ geladene Oberfläche für eine Unterstützung der Autoaktivierung der Komponenten der Kontaktphase fungieren könnten, wurde in der Literatur bisher übersehen (WIGGINS et al., 1979; MILLER et al., 1980; SILVERBERG et al., 1980; DUNN et al., 1982; ESPANA et al., 1983; TANKERSLEY et al., 1984). Wenige Publikationen beschreiben eine extrazelluläre Wirkung von RNA. Ein methodischer Ansatz beschreibt die inhibitorische Wirkung von konstruierten RNA-Aptameren auf den FIX (RUSCONI et al., 2002). Doppelsträngige, extrazelluläre RNA

induziert die Aktivierung der Immunabwehr durch eine Bindung an den Toll-like-receptorII (ALEXOPOULOU et al., 2001). Interessanterweise exprimieren z.B. Endothelzellen eine große Menge an RNase (LANDRE et al., 2002), deren physiologischer Sinn bisher unerschlossen ist und man könnte darüber spekulieren, ob dadurch vielleicht auch die antithrombotische Funktion des Endothels erhöht wird.

## 5. Zusammenfassung

Die FSAP ist eine 64 kDa-Serinprotease aus humanem Plasma, die sowohl den Blutgerinnungsfaktor VII als auch die Plasminogen-Aktivatoren Prourokinase und „tissue type plasminogen activator (tPA)“ aktivieren kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die FSAP durch eine Antikörper-Affinitätschromatographie mit anschließender Anionen-Austauschchromatographie aus humanem Plasma isoliert. Aktivierungsstudien des Proenzyms der FSAP (Einketten-FSAP) zeigten, dass die Einketten-FSAP einer autokatalytischen Aktivierung zur aktiven FSAP (Zweiketten-FSAP) unterliegt, die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verzögert wird. Extrazelluläre Substanzen wie Heparin beschleunigten die FSAP-Autoaktivierung. Da die Gerinnung in Komplexen an der Zellmembran abläuft und die Interaktion der FSAP mit Substanzen der Zellmembran, wie Glycosaminoglycanen, und extrazellulären Substanzen, wie Hyaluronsäure, bewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass die FSAP mit Zellen interagiert.

In diesem Zusammenhang zeigte die FSAP eine Inhibition der PDGF-BB-vermittelten Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen in heparinabhängiger Weise. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die FSAP die Bindung von PDGF-BB an die Zelloberfläche inhibieren kann, was zu einem Ausbleiben eines stimulatorischen Signals an die Zelle führt und dadurch die stimulatorische PDGF-BB-Wirkung auf den Zellen unterbindet. Eine Hypothese für den Mechanismus der FSAP-Wirkung ist, dass die Autoaktivierung der FSAP in der Gegenwart von Glycosaminoglycanen zu FSAP-Fragmenten führt, die PDGF-BB mit hoher Affinität binden und dadurch die PDGF-BB-Wirkung inhibieren. Eine Identifizierung dieser FSAP-Fragmente steht noch aus. Ob diese Hypothese z.B. auch für die RNA-vermittelte Autoaktivierung der FSAP zutrifft, werden zukünftige Versuche zeigen müssen.

Interessanterweise wurde RNA als zellulärer Cofaktor der FSAP-Autoaktivierung gefunden. RNA aus unterschiedlichen Quellen konnte die FSAP in vergleichbarer Weise aktivieren, wie es für Heparin beschrieben worden ist. Bindungsversuche mit immobilisierter FSAP bewiesen eine Interaktion der FSAP mit RNA sowohl im isolierten System als auch in einem konditionierten Medium.

RNA hatte einen deutlich verkürzenden, FSAP-unabhängigen Einfluß auf die Rekalzifizierungszeit von humanem Plasma. Da diese RNA-Funktion nicht auf die FSAP zurückgeführt werden konnte, wurden andere Gerinnungsfaktoren gesucht, die auf RNA reagieren und Prekallikrein als Ziel der RNA-induzierten Verkürzung der Blutgerinnung gefunden. Aus diesem Aspekt ergibt sich ein neues Schema der Blutgerinnung, indem die Assemblierung des Kontaktphasen-Komplexes nicht mehr auf der initialen Autoaktivierung von FXII beruht. Die RNA-vermittelte Aktivierung von Prekallikrein führt zu der Bildung des



Kontaktphasen-Komplexes, in dem FXII zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert wird. So wurde die langgesuchte, natürliche, negativ geladene Oberfläche nicht als Aktivator für FXII sondern als Prekallikrein-Aktivator gefunden.

Aus diesen Befunden ergeben sich unterschiedliche Möglichkeiten der physiologischen Bedeutung der FSAP. So könnte die Autoaktivierung der FSAP an Zelloberflächen, insbesondere an Zelloberflächen in atherosklerotischen Plaques, eine signifikante Rolle in der Entwicklung der Atherosklerose spielen. Die Inhibierung der PDGF-BB-vermittelten Proliferation von glatten Muskelzellen, die Degradation von bFGF durch FSAP und die deutliche Assoziierung der MarburgI-Mutante mit geringer FSAP-Aktivität mit Atherosklerose deuten auf eine negativ-regulierende Funktion von FSAP in diesem Zusammenhang hin. Auch der Befund, dass RNA die Blutgerinnung über Prekallikrein verkürzen kann, hat eine weitreichende Konsequenz. So könnte die Bestimmung der extrazellulären RNA-Konzentration im Blut möglicherweise eine Assoziierung mit Thrombosen aufzeigen, und folglich RNase als ein anti-Thrombose-Agenz eingesetzt werden. Es werden noch weitere Experimente nötig sein, die diese Befunde unterstreichen und die Rolle von RNA in der Blutgerinnung weiter aufklären.

## Referenzen

- Abildgaard, C. F. and Harrison, J. (1974): "Fletcher factor deficiency: family study and detection." **Blood** 43(5): 641-4.
- Abildgaard, U. (1969): "Binding of thrombin to antithrombin III." **Scand J Clin Lab Invest** 24(1): 23-7.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. and Flavell, R. A. (2001): "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll- like receptor 3." **Nature** 413(6857): 732-8.
- Alm, A. K., Norstrom, E., Sundelin, J. and Nystedt, S. (1999): "Stimulation of proteinase activated receptor-2 causes endothelial cells to promote blood coagulation in vitro." **Thromb Haemost** 81(6): 984-8.
- Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C. and Stroun, M. (2001): "Circulating nucleic acids in plasma or serum." **Clin Chim Acta** 313(1-2): 143-6.
- Anker, P., Mulcahy, H. and Stroun, M. (2003): "Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: time for large-scale clinical studies?" **Int J Cancer** 103(2): 149-52.
- Barnathan, E. S., Kuo, A., Rosenfeld, L., Kariko, K., Leski, M., Robbiati, F., Nolli, M. L., Henkin, J. and Cines, D. B. (1990): "Interaction of single-chain urokinase-type plasminogen activator with human endothelial cells." **J Biol Chem** 265(5): 2865-72.
- Belamarich, F. A. (1976): "Hemostasis in animals other than mammals: the role of cells." **Prog Hemost Thromb** 3: 191-209.
- Biggs, R., Douglas, A. S. and Macfarlane, R. G. (1952): "Christmas disease: A condition previously mistaken for haemophilia." **Br Med J** 2: 1378-81.
- Billiau, A., Edy, V. G., Heremans, H., Van Damme, J., Desmyter, J., Georgiades, J. A. and De Somer, P. (1977): "Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG- 63." **Antimicrob Agents Chemother** 12(1): 11-5.
- Brodrick, J. W., Largman, C., Johnson, J. H. and Geokas, M. C. (1978): "Human cationic trypsinogen. Purification, characterization, and characteristics of autoactivation." **J Biol Chem** 253(8): 2732-6.
- Camerer, E., Huang, W. and Coughlin, S. R. (2000): "Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa." **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(10): 5255-60.
- Choi-Miura, N. H., Saito, K., Takahashi, K., Yoda, M. and Tomita, M. (2001): "Regulation mechanism of the serine protease activity of plasma hyaluronan binding protein." **Biol Pharm Bull** 24(3): 221-5.
- Choi-Miura, N. H., Takahashi, K., Yoda, M., Saito, K., Mazda, T. and Tomita, M. (2001): "Proteolytic activation and inactivation of the serine protease activity of plasma hyaluronan binding protein." **Biol Pharm Bull** 24(5): 448-52.
- Choi-Miura, N. H., Tobe, T., Sumiya, J., Nakano, Y., Sano, Y., Mazda, T. and Tomita, M. (1996): "Purification and characterization of a novel hyaluronan-binding protein (PHBP) from human plasma: it has three EGF, a kringle and a serine protease domain, similar to hepatocyte growth factor activator." **J Biochem (Tokyo)** 119(6): 1157-65.

- Choi-Miura, N. H., Yoda, M., Saito, K., Takahashi, K. and Tomita, M.* (2001): "Identification of the substrates for plasma hyaluronan binding protein." **Biol Pharm Bull** 24(2): 140-3.
- Clemetson, K. J. and Clemetson, J. M.* (2001): "Platelet collagen receptors." **Thromb Haemost** 86(1): 189-97.
- Clowes, A. W. and Karnowsky, M. J.* (1977): "Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries." **Nature** 265(5595): 625-6.
- Collen, D.* (1999): "The plasminogen (fibrinolytic) system." **Thromb. Haemost.** 82(2): 259-71.
- Colman, R. W. and Schmaier, A. H.* (1997): "Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes." **Blood** 90(10): 3819-43.
- Countaway, J. L., Girones, N. and Davis, R. J.* (1989): "Reconstitution of epidermal growth factor receptor transmodulation by platelet-derived growth factor in Chinese hamster ovary cells." **J Biol Chem** 264(23): 13642-7.
- Davie, E. W. and Ratnoff, O. D.* (1964): "Waterfall sequence for intrinsic blood coagulation." **Science** 145: 1310-1.
- Dunn, J. T., Silverberg, M. and Kaplan, A. P.* (1982): "The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein." **J Biol Chem** 257(4): 1779-84.
- Edmann, P. and Begg, G.* (1967): "A protein sequenator." **Eur. J. Biochem.** 1: 80-91.
- Eil, C. and Wool, I. G.* (1974): "Phosphorylation of ribosomal proteins: preparation of rat liver ribosomal protein kinases. Assay of the phosphorylation of ribosomal subunit proteins. Assay of the function of phosphorylated ribosomes." **Methods Enzymol** 30(0): 590-601.
- Elodi, S. and Varadi, K.* (1979): "Optimization of conditions for the catalytic effect of the factor IXa- factor VIII complex: probable role of the complex in the amplification of blood coagulation." **Thromb Res** 15(5-6): 617-29.
- Esmon, C. T.* (2001): "Role of coagulation inhibitors in inflammation." **Thromb Haemost** 86: 51-6.
- Esmon, C. T. and Suttie, J. W.* (1976): "Vitamin K-dependent carboxylase. Solubilization and properties." **J Biol Chem** 251(20): 6238-43.
- Espana, F. and Ratnoff, O. D.* (1983): "Activation of Hageman factor (factor XII) by sulfatides and other agents in the absence of plasma proteases." **J Lab Clin Med** 102(1): 31-45.
- Etscheid, M., Beer, N., Fink, E., Seitz, R. and Johannes, D.* (2002): "The hyaluronan-binding serine protease from human plasma cleaves HMW and LMW kininogen and releases bradykinin." **Biol Chem** 383(10): 1633-43.
- Etscheid, M., Beer, N., Krefß, J., Seitz, R. and Dodt, J.* (2003). "Differential regulation of endothelial cell and lung fibroblast proliferation by the hyaluronan-binding protease". 47. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V., **Innsbruck**.
- Etscheid, M., Beer, N., Seitz, R. and Dodt, J.* (2002): "Regulation of the plasma hyaluronan binding serine protease." **Ann. Haematol.** 81(Suppl. 1): A 16.

- Etscheid, M., Hunfeld, A., König, H., Seitz, R. and Dodt, J.* (2000): "Activation of proPHBSP, the zymogen of a plasma hyaluronan binding serine protease, by an intermolecular autocatalytic mechanism." **Biol Chem** 381(12): 1223-31.
- Fay, W. P., Shapiro, A. D., Shih, J. L., Schleef, R. R. and Ginsburg, D.* (1992): "Brief report: complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame-shift mutation." **N Engl J Med** 327(24): 1729-33.
- Fenton, J. W., 2nd* (1986): "Thrombin." **Ann N Y Acad Sci** 485: 5-15.
- Fisher, C. J., Jr. and Yan, S. B.* (2000): "Protein C levels as a prognostic indicator of outcome in sepsis and related diseases." **Crit Care Med** 28(9 Suppl): S49-56.
- Fitzgerald, D. J.* (2001): "Vascular biology of thrombosis: the role of platelet-vessel wall adhesion." **Neurology** 57(5(Suppl 2)): S1-4.
- Fuentes-Prior, P., Iwanaga, Y., Huber, R., Pagila, R., Rumennik, G., Seto, M., Morser, J., Light, D. R. and Bode, W.* (2000): "Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin- thrombomodulin complex." **Nature** 404(6777): 518-25.
- Gailani, D. and Broze, G. J., Jr.* (1993): "Factor XII-independent activation of factor XI in plasma: effects of sulfatides on tissue factor-induced coagulation." **Blood** 82(3): 813-9.
- Garg, H. G., Thompson, B. T. and Hales, C. A.* (2000): "Structural determinants of antiproliferative activity of heparin on pulmonary artery smooth muscle cells." **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 279(5): L779-89.
- Gawaz, M.* (1999): "Das Blutplättchen". Stuttgart, **Georg Thieme Verlag**.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H.* (1989): "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." **Anal Biochem** 182(2): 319-26.
- Goodnough, L. T., Saito, H. and Ratnoff, O. D.* (1983): "Thrombosis or myocardial infarction in congenital clotting factor abnormalities and chronic thrombocytopenias: a report of 21 patients and a review of 50 previously reported cases." **Medicine (Baltimore)** 62(4): 248-55.
- Gouin-Thibault, I., Achkar, A. and Samama, M. M.* (2001): "The thrombophilic state in cancer patients." **Acta Haematol** 106(1-2): 33-42.
- Gurewich, V., Johnstone, M., Loza, J. P. and Pannell, R.* (1993): "Pro-urokinase and prekallikrein are both associated with platelets. Implications for the intrinsic pathway of fibrinolysis and for therapeutic thrombolysis." **FEBS Lett** 318(3): 317-21.
- Guyton, J. R., Rosenberg, R. D., Clowes, A. W. and Karnovsky, M. J.* (1980): "Inhibition of rat arterial smooth muscle cell proliferation by heparin. In vivo studies with anticoagulant and nonanticoagulant heparin." **Circ Res** 46(5): 625-34.
- Hashimoto, K., Tobe, T., Sumiya, J., Saguchi, K., Sano, Y., Nakano, Y., Choi-Miura, N. H. and Tomita, M.* (1997): "Cloning of the cDNA for a mouse homologue of human PHBP: a novel hyaluronan-binding protein." **Biol Pharm Bull** 20(11): 1127-30.
- Hildebrandt, H., Ed. (1998): "Psyhyrembel Klinisches Wörterbuch". Berlin, **de Gruyter**.
- Hoover, R. L., Rosenberg, R., Haering, W. and Karnovsky, M. J.* (1980): "Inhibition of rat arterial smooth muscle cell proliferation by heparin. II. In vitro studies." **Circ Res** 47(4): 578-83.

- Hunfeld, A., Etscheid, M., König, H., Seitz, R. and Dodt, J.* (1999): "Detection of a novel plasma serine protease during purification of vitamin K-dependent coagulation factors." **FEBS Lett** 456(2): 290-4.
- Ilies, M. A., Scozzafava, A. and Supuran, C. T.* (2002): "Therapeutic applications of serine protease inhibitors." **Expert Opin. Ther. Patents** 12(8): 1181-214.
- Iwanaga, S. and Kawabata, S.* (1998): "Evolution and phylogeny of defense molecules associated with innate immunity in horseshoe crab." **Front Biosci** 3: D973-84.
- Joseph, K., Tholanikunnel, B. G. and Kaplan, A. P.* (2002): "Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein- kininogen complex in the absence of factor XII." **Proc Natl Acad Sci U S A** 99(2): 896-900.
- Kannemeier, C., Tannert-Otto, S., Römisch, J., Kanse, S. M. and Preissner, K. T.* (2003). "Factor Seven activating protease (FSAP) is an inhibitor of platelet derived growth factor-BB-mediated migratory and mitogenic activities". 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), **Innsbruck, Austria**.
- Kanse, S. M., Benzakour, O., Kanthou, C., Kost, C., Lijnen, H. R. and Preissner, K. T.* (1997): "Induction of vascular SMC proliferation by urokinase indicates a novel mechanism of action in vasoproliferative disorders." **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 17(11): 2848-54.
- Kay, J. and Kassell, B.* (1971): "The autoactivation of trypsinogen." **J Biol Chem** 246(21): 6661-5.
- Kazama, Y., Hamamoto, T., Foster, D. C. and Kisiel, W.* (1995): "Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to thrombin formation." **J Biol Chem** 270(1): 66-72.
- Kazi, M., Lundmark, K., Religa, P., Gouda, I., Larm, O., Ray, A., Swedenborg, J. and Hedin, U.* (2002): "Inhibition of rat smooth muscle cell adhesion and proliferation by non-anticoagulant heparins." **J Cell Physiol** 193(3): 365-72.
- Koolman, J. and Röhm, K.-H.* (1998): "Taschenatlas der Biochemie". Stuttgart, **Georg Thieme Verlag**.
- Kreß, J., Seitz, R., Dodt, J. and Etscheid, M.* (2002): "Interaction of the plasma hyaluronan binding serine protease with extracellular matrix proteins." **Ann. Haematol.** 81(Suppl. 1): A 47.
- Landre, J. B., Hewett, P. W., Olivot, J. M., Friedl, P., Ko, Y., Sachinidis, A. and Moenner, M.* (2002): "Human endothelial cells selectively express large amounts of pancreatic-type ribonuclease (RNase 1)." **J Cell Biochem** 86(3): 540-52.
- Langer, F., Morys-Wortmann, C., Kusters, B. and Storck, J.* (1999): "Endothelial protease-activated receptor-2 induces tissue factor expression and von Willebrand factor release." **Br J Haematol** 105(2): 542-50.
- Lenich, C., Liu, J. N. and Gurewich, V.* (1997): "Thrombin stimulation of platelets induces plasminogen activation mediated by endogenous urokinase-type plasminogen activator." **Blood** 90(9): 3579-86.
- Lenich, C., Pannell, R. and Gurewich, V.* (1995): "Assembly and activation of the intrinsic fibrinolytic pathway on the surface of human endothelial cells in culture." **Thromb Haemost** 74(2): 698-703.

- Levi, M., Hack, C. E., de Boer, J. P., Brandjes, D. P., Buller, H. R. and ten Cate, J. W. (1992): "Contact system dependent fibrinolytic activity in vivo: observations in healthy subjects and factor XII deficient patients." **Agents Actions Suppl** 38(( Pt 2)): 292-8.
- Loeb, L. (1909): "Über die zweite Gerinnung des Blutes von Limulus." **Biochem. Ztschr.** 16: 157.
- Loeb, L. (1910): "Über die Blutgerinnung bei Wirbellosen." **Biochem. Ztschr.** 24: 478.
- Loza, J. P., Gurewich, V., Johnstone, M. and Pannell, R. (1994): "Platelet-bound prekallikrein promotes pro-urokinase-induced clot lysis: a mechanism for targeting the factor XII dependent intrinsic pathway of fibrinolysis." **Thromb Haemost** 71(3): 347-52.
- Lusis, A. J. (2000): "Atherosclerosis." **Nature** 407: 233-41.
- Macfarlane, R. G. (1964): "An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier." **Nature** 202: 498-9.
- Mahdi, F., Madar, Z. S., Figueroa, C. D. and Schmaier, A. H. (2002): "Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes." **Blood** 99(10): 3585-96.
- Mahone, M., Saffman, E. E. and Lasko, P. F. (1995): "Localized Bicaudal-C RNA encodes a protein containing a KH domain, the RNA binding motif of FMR1." **Embo J** 14(9): 2043-55.
- Mann, K. G. (1999): "Biochemistry and Physiology of Blood Coagulation." **Thromb. Haemost.** 82(2): 165-75.
- Mann, K. G., Nesheim, M. E., Church, W. R., Haley, P. and Krishnaswamy, S. (1990): "Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes." **Blood** 76(1): 1-16.
- Mari, B., Guerin, S., Far, D., Breitmayer, J., Belhance, N., Peyron, J., Rossi, B. and Auberger, P. (1996): "Thrombin and trypsin-induced Ca(2+) mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors." **FASEB J** 10(2): 309-16.
- Mast, A. E. and Broze, G. J., Jr. (1996): "Physiological concentrations of tissue factor pathway inhibitor do not inhibit prothrombinase." **Blood** 87(5): 1845-50.
- Masys, D. R., Bajaj, S. P. and Rapaport, S. I. (1982): "Activation of human factor VII by activated factors IX and X." **Blood** 60(5): 1143-50.
- McBride, W., Lange, R. A. and Hillis, L. D. (1988): "Restenosis after successful coronary angioplasty. Pathophysiology and prevention." **N Engl J Med** 318(26): 1734-7.
- McNamara, C. A., Sarembock, I. J., Gimple, L. W., Fenton, J. W., 2nd, Coughlin, S. R. and Owens, G. K. (1993): "Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor." **J Clin Invest** 91(1): 94-8.
- Miller, G., Silverberg, M. and Kaplan, A. P. (1980): "Autoactivatability of human Hageman factor (factor XII)." **Biochem Biophys Res Commun** 92(3): 803-10.
- Molino, M., Woolkalis, M. J., Reavey-Cantwell, J., Pratico, D., Andrade-Gordon, P., Barnathan, E. S. and Brass, L. F. (1997): "Endothelial cell thrombin receptors and PAR-2. Two protease-activated receptors located in a single cellular environment." **J Biol Chem** 272(17): 11133-41.
- Morrissey, J. H. (2001): "Tissue factor: An enzyme cofactor and a true receptor." **Thromb Haemost** 86(1): 66-75.

- Naito, K. and Fujikawa, K. (1991): "Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces." **J Biol Chem** 266(12): 7353-8.
- Nakagaki, T., Foster, D. C., Berkner, K. L. and Kiesel, W. (1991): "Initiation of the extrinsic pathway of blood coagulation: evidence for the tissue factor dependent autoactivation of human coagulation factor VII." **Biochemistry** 30(45): 10819-24.
- Ng, E. K., Tsui, N. B., Lam, N. Y., Chiu, R. W., Yu, S. C., Wong, S. C., Lo, E. S., Rainer, T. H., Johnson, P. J. and Lo, Y. M. (2002): "Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals." **Clin Chem** 48(8): 1212-7.
- Osterud, B. and Rapaport, S. I. (1977): "Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation." **Proc Natl Acad Sci U S A** 74(12): 5260-4.
- Owen, C. A. (2001): "A history of blood coagulation". Rochester, **Mayo Foundation for Medical Education and Research**.
- Patel, M. K., Mulloy, B., Gallagher, K. L., O'Brien, L. and Hughes, A. D. (2002): "The antimitogenic action of the sulphated polysaccharide fucoidan differs from heparin in human vascular smooth muscle cells." **Thromb Haemost** 87(1): 149-54.
- Patterson, C., Stouffer, G. A., Madamanchi, N. and Runge, M. S. (2001): "New tricks for old dogs: nonthrombotic effects of thrombin in vessel wall biology." **Circ Res** 88(10): 987-97.
- Pearson, J. D. (1994): "Endothelial cell function and thrombosis." **Baillieres Clin Haematol** 7(3): 441-52.
- Pedersen, A. H., Lund-Hansen, T., Bisgaard-Frantzen, H., Olsen, F. and Petersen, L. C. (1989): "Autoactivation of human recombinant coagulation factor VII." **Biochemistry** 28(24): 9331-6.
- Rao, L. V. and Rapaport, S. I. (1988): "Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation." **Proc Natl Acad Sci U S A** 85(18): 6687-91.
- Ratnoff, O. D. and Colopy, J. E. (1955): "Familial hemorrhagic trait associated with deficiency of clot promoting fraction of plasma." **J Clin Invest** 34(602).
- Rhodes, D. and Klug, A. (1993): "Zinc fingers." **Sci Am** 268(2): 56-9, 62-5.
- Riewald, M., Petrovan, R. J., Donner, A., Mueller, B. M. and Ruf, W. (2002): "Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway." **Science** 296(5574): 1880-2.
- Riewald, M. and Ruf, W. (2001): "Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor." **Proc Natl Acad Sci U S A** 98(14): 7742-7.
- Riewald, M. and Ruf, W. (2002): "Orchestration of coagulation protease signaling by tissue factor." **Trends Cardiovasc Med** 12(4): 149-54.
- Rojkjaer, R., Hasan, A. A., Motta, G., Schousboe, I. and Schmaier, A. H. (1998): "Factor XII does not initiate prekallikrein activation on endothelial cells." **Thromb Haemost** 80(1): 74-81.
- Romisch, J. (2002): "Factor VII activating protease (FSAP): a novel protease in hemostasis." **Biol Chem** 383(7-8): 1119-24.

- Romisch, J., Feussner, A., Vermohlen, S. and Stohr, H. A.* (1999): "A protease isolated from human plasma activating factor VII independent of tissue factor." **Blood Coagul Fibrinolysis** 10(8): 471-9.
- Römisch, J., Stöhr, H.-A., Feussner, A., Kleinhenn, M., Nakazawa, F., Kannemeier, C. and Preissner, K. T.* (2002). "The contribution of the Factor VII activating protease (FSAP) to coagulation and fibrinolysis". 45. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), **Erfurt, Germany**, Annals of Hematology.
- Romisch, J., Vermohlen, S., Feussner, A. and Stohr, H.* (1999): "The FVII activating protease cleaves single-chain plasminogen activators." **Haemostasis** 29(5): 292-9.
- Rosing, J., Tans, G., Govers-Riemslog, J. W., Zwaal, R. F. and Hemker, H. C.* (1980): "The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex." **J Biol Chem** 255(1): 274-83.
- Ruggeri, Z. M.* (2002): "Platelets in atherothrombosis." **Nat Med** 8(11): 1227-34.
- Rusconi, C. P., Scardino, E., Layzer, J., Pitoc, G. A., Ortel, T. L., Monroe, D. and Sullenger, B. A.* (2002): "RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa." **Nature** 419(6902): 90-4.
- Saito, Y., Haendeler, J., Hojo, Y., Yamamoto, K. and Berk, B. C.* (2001): "Receptor Heterodimerization: Essential Mechanism for Platelet-Derived Growth Factor-Induced Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation." **Mol. Cell. Biol.** 21(19): 6387-94.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F. and Ruggeri, Z. M.* (1998): "Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow." **Cell** 94(5): 657-66.
- Schafer, A. I.* (1994): "Thrombosis and Hemorrhage". Boston, **Blackwell Science**.
- Schmaier, A. H., Rojkaer, R. and Sharidat-Madar, Z.* (1999): "Activation of the plasma Kallikrein/Kinin system on cells: a revised hypothesis." **Thromb. Haemost.** 82(2): 226-33.
- Schousboe, I.* (1993): "Contact activation in human plasma is triggered by zinc ion modulation of factor XII (Hageman factor)." **Blood Coagul Fibrinolysis** 4(5): 671-8.
- Shibayama, Y., Brunnee, T., Kaplan, A. P. and Reddigari, S.* (1994): "Activation of human Hageman factor (factor XII) in the presence of zinc and phosphate ions." **Braz J Med Biol Res** 27(8): 1817-28.
- Shore, J. D., Day, D. E., Bock, P. E. and Olson, S. T.* (1987): "Acceleration of surface-dependent autocatalytic activation of blood coagulation factor XII by divalent metal ions." **Biochemistry** 26(8): 2250-8.
- Shu, F., Kobayashi, H., Fukudome, K., Tsuneyoshi, N., Kimoto, M. and Terao, T.* (2000): "Activated protein C suppresses tissue factor expression on U937 cells in the endothelial protein C receptor-dependent manner." **FEBS Lett** 477: 208-12.
- Siewing, R.* (1980): "Lehrbuch der Zoologie; Bd. 1 Allgemeine Zoologie". Stuttgart, **Gustav Fischer Verlag**.
- Silverberg, M., Dunn, J. T., Garen, L. and Kaplan, A. P.* (1980): "Autoactivation of human Hageman factor. Demonstration utilizing a synthetic substrate." **J Biol Chem** 255(15): 7281-6.



- Silverberg, M., Nicoll, J. E. and Kaplan, A. P.* (1980): "The mechanism by which the light chain of cleaved HMW-kininogen augments the activation of prekallikrein, factor XI and Hageman factor." **Thromb Res** 20(2): 173-89.
- Slupsky, J. R., Kalbas, M., Willuweit, A., Henn, V., Krocze, R. A. and Muller-Berghaus, G.* (1998): "Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40." **Thromb Haemost** 80(6): 1008-14.
- St Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G. and Jantsch, M.* (1992): "A conserved double-stranded RNA-binding domain." **Proc Natl Acad Sci U S A** 89(22): 10979-83.
- Stenflo, J., Fernlund, P., Egan, W. and Roepstorff, P.* (1974): "Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin." **Proc Natl Acad Sci U S A** 71(7): 2730-3.
- Stepanova, V., Mukhina, S., Kohler, E., Resink, T. J., Erne, P. and Tkachuk, V. A.* (1999): "Urokinase plasminogen activator induces human smooth muscle cell migration and proliferation via distinct receptor-dependent and proteolysis-dependent mechanisms." **Mol Cell Biochem** 195(1-2): 199-206.
- Stern, D. M., Kaiser, E. and Nawroth, P. P.* (1988): "Regulation of the coagulation system by vascular endothelial cells." **Haemostasis** 18(4-6): 202-14.
- Stryer, L.* (1994): "Biochemie". Heidelberg, **Spektrum Akademischer Verlag**.
- Sumiya, J., Asakawa, S., Tobe, T., Hashimoto, K., Saguchi, K., Choi-Miura, N. H., Shimizu, Y., Minoshima, S., Shimizu, N. and Tomita, M.* (1997): "Isolation and characterization of the plasma hyaluronan-binding protein (PHBP) gene (HABP2)." **J Biochem (Tokyo)** 122(5): 983-90.
- Tankersley, D. L. and Finlayson, J. S.* (1984): "Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII." **Biochemistry** 23(2): 273-9.
- Tans, G. and Rosing, J.* (1987): "Structural and functional characterization of factor XII." **Semin Thromb Hemost** 13(1): 1-14.
- Tans, G., Rosing, J., Berrettini, M., Lammle, B. and Griffin, J. H.* (1987): "Autoactivation of human plasma prekallikrein." **J Biol Chem** 262(23): 11308-14.
- Tans, G., Rosing, J. and Griffin, J. H.* (1983): "Sulfatide-dependent autoactivation of human blood coagulation Factor XII (Hageman Factor)." **J Biol Chem** 258(13): 8215-22.
- Thompson, R. E., Mandle, R., Jr. and Kaplan, A. P.* (1979): "Studies of binding of prekallikrein and Factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain." **Proc Natl Acad Sci U S A** 76(10): 4862-6.
- Torres-Rosado, A., O'Shea, K. S., Tsuji, A., Chou, S. H. and Kurachi, K.* (1993): "Hepsin, a putative cell-surface serine protease, is required for mammalian cell growth." **Proc Natl Acad Sci U S A** 90(15): 7181-5.
- Verheijen, J. H., Chang, G. T. and Kluft, C.* (1984): "Evidence for the occurrence of a fast-acting inhibitor for tissue-type plasminogen activator in human plasma." **Thromb Haemost** 51(3): 392-5.
- Vostrov, A. A. and Quitschke, W. W.* (2000): "Plasma hyaluronan binding protein is a serine protease." **J Biol Chem** 275(30): 22978-85.
- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. and Coughlin, S. R.* (1991): "Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation." **Cell** 64(6): 1057-68.

- Weitz, J. I., Hudoba, M., Massel, D., Maraganore, J. and Hirsh, J.* (1990): "Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin- antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III- independent inhibitors." **J Clin Invest** 86(2): 385-91.
- Wiggins, R. C., Bouma, B. N., Cochrane, C. G. and Griffin, J. H.* (1977): "Role of high-molecular-weight kininogen in surface-binding and activation of coagulation Factor XI and prekallikrein." **Proc Natl Acad Sci U S A** 74(10): 4636-40.
- Wiggins, R. C. and Cochrane, C. C.* (1979): "The autoactivation of rabbit Hageman factor." **J Exp Med** 150(5): 1122-33.
- Willeit, J., Kiechl, S., Weimer, T., Mair, A., Santer, P., Wiedermann, C. J. and Roemisch, J.* (2003): "Marburg I polymorphism of factor VII--activating protease: a prominent risk predictor of carotid stenosis." **Circulation** 107(5): 667-70.
- Williamson, J. R.* (2000): "Induced fit in RNA-protein recognition." **Nat Struct Biol** 7(10): 834-7.
- Wuepper, K. D.* (1973): "Prekallikrein deficiency in man." **J Exp Med** 138(6): 1345-55.

### *Eigene Publikationen*

- Kannemeier, C., Feussner, A., Stohr, H. A., Weisse, J., Preissner, K. T. and Romisch, J. (2001): "Factor VII and single-chain plasminogen activator-activating protease: activation and autoactivation of the proenzyme." **Eur J Biochem** 268(13): 3789-96.
- Kannemeier, C., Römisch, J., Preissner, K. T. and Kanse, S. M. (2003): "Factor VII activating protease (FSAP) inhibits growth factor-mediated cell proliferation and migration of vascular smooth muscle cells." **Im Review-Prozess.**
- Kannemeier, C., Nakazawa, F., Trusheim, H., Shibamiya, A., Engelmann, B. and Preissner, K. T. (2003): "Extracellular RNA is a procoagulant cofactor for blood clotting." **Eingereicht.**
- Nakazawa, F., Kannemeier, C., Trusheim, H. and Preissner, K. T. (2003): "Activation of Factor VII activating protease by cell derived ribonucleotids." **In Vorbereitung.**

### *Kongressbeiträge*

- Kannemeier, C., Stöhr, H.-A., Feussner, A., Weisse, J. and Römisch, J. (2001). Activators of the Factor VII activating protease (FSAP). XVIIIth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Paris, France, **Suppl. Thromb. Haem.**
- Kannemeier, C., Kanse, S. M., Römisch, J. and Preissner, K. T. (2002). Factor VII and single-chain plasminogen activating protease (FSAP) regulated the proliferation of human vascular smooth muscle cells. 45. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Erfurt, Germany, **Annals of Hematology**, Supp. 1, Vol. 81: A 69.
- Nakazawa, F., Kannemeier, C., Römisch, J. and Preissner, K. T. (2002). Cellular effector enhance the autoactivation of the Factor VII activating protease (FSAP). 45. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Erfurt, Germany, **Annals of Hematology**, Supp. 1, Vol. 81: A 69.
- Knoblauch, B., Kellert, J., Battmann, A., Kannemeier, C., Preissner, K. T. and Römisch, J. (2002). Histologic examination of the tissue distribution of the Factor VII activating protease. 45. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Erfurt, Germany, **Annals of Hematology**, Supp. 1, Vol. 81: A 69.
- Römisch, J., Stöhr, H.-A., Feussner, A., Kleinhenn, M., Nakazawa, F., Kannemeier, C. and Preissner, K. T. (2002). The contribution of the Factor VII activating protease (FSAP) to coagulation and fibrinolysis. 45. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Erfurt, Germany, **Annals of Hematology**, Supp. 1, Vol. 81: A 69.
- Kannemeier, C., Tannert-Otto, S., Römisch, J., Kanse, S. M. and Preissner, K. T. (2003). Factor Seven activating protease (FSAP) is an inhibitor of platelet derived growth factor-BB-mediated migratory and mitogenic activities. 46. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH), Innsbruck, Austria.

## ***Danksagung***

Ich danke Herrn Prof. Dr. *Klaus T. Preissner* für die immerwährende Diskussionsbereitschaft, die tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit und für Durchhalteparolen während der Durststrecken.

Herrn Dr. *Jürgen Römisch* danke ich im besonderen Masse, dafür dass er mir die Chance gegeben hat in seinem Labor bei Aventis Behring zu arbeiten. Die moralische und theoretische Unterstützung hat mir sehr weitergeholfen.

Herrn Prof. Dr. *Alfred Pingoud* danke ich für die Betreuung meiner Arbeit für den Fachbereich Biologie.

Außerdem danke ich Herrn PD Dr. *Bernd Werding* für die Bereitschaft über meine Arbeit ein Gutachten zu schreiben.

PD Dr. *Sandip M. Kanse* danke ich für die Einweisung in das Labor Preissner und viele Diskussionen über Theorie und Praxis. Das offene Ohr hat mir vieles verdeutlicht.

Desweiteren danke ich *Hans-Arnold Stöhr, Annette Feussner, Harald Stauss* und *Jörg Weisse* für die Einweisung in die Arbeit bei Aventis Behring und für die Geduld in zahllosen Erklärungen zu Methodik und theoretischem Hintergrund. „Man braucht halt gute Leute.“

*Thomas Schmidt-Wöll, Susanne Tannert-Otto, Veronika Schmidt* und *Uwe Schubert* bin ich dankbar für praktische Unterstützung sowie einer Menge Spaß im Labor.

Dr. *Heidi Trusheim, Joong-Sup Rhee* und Dr. *Triantafyllos Chavakis* bin ich für viele Diskussionen, Erklärungen und intensiven Gesprächen dankbar. Es half mir Theorien und Hintergründe zu verstehen und daraus gemeinsam mit ihnen neue zu entwickeln.

*Fumie Nakazawa* und *Aya Shibamiya* haben einen maßgeblichen, japanischen Anteil an meiner Arbeit gehabt. Ich habe viel von Euch gelernt. Dafür vielen Dank. Ohayo Kosay-mas!

*Daniel* und *Julia Schaft* bin ich dafür dankbar, dass sie zu meiner Familie gehören und außerdem für viele Paper, die von Dresden nach Giessen elektronisch übermittelt wurden.

Meinen *Eltern* danke ich für endlose Möglichkeiten, die sie mir geöffnet haben und viel Geduld für mich während meines Erwachsenwerdens (dauert noch an).

Unendlich dankbar bin ich meiner Frau *Jessica*, die soviel Geduld für mich aufgebracht hat, soviel Korrektur gelesen hat, mir immer wieder die Chemie erklärt und mich auch sonst immer nur unterstützt. Du bist unersetzlich.